

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



Tenascina C en las vesículas extracelulares con Caveolina-1 aumenta la migración/invasión de las células de cáncer de mama mediante su captación dependiente de integrina $\alpha\beta3$ y promueve la formación de redes vasculares de las células endoteliales

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Doctor en Farmacología por:

Renato Alberto Burgos Ravanal

Directores de Tesis:

Dr. Andrew Quest

Dra. Lisette Leyton

Santiago - CHILE

2022

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

Renato Alberto Burgos Ravanal

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Farmacología, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

Dr. Andrew Quest

Co-directora de Tesis:

Dra. Lisette Leyton

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Juan Diego Maya (Presidente)

Dra. Roxana Pincheira

Dr. Vicente Torres

Dr. Julio Tapia

Dedicatoria

A Clara Ema, mi madre, que me amó durante toda su vida...

A Rayen, mi compañera, a quien amaré el resto de mi vida...

A ambas quiero dedicarles este humilde trabajo y agradecerles por siempre acompañarme, apoyarme, alentarme, orientarme, por permitirme ser yo mismo y por llenar mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer sinceramente,

A mis tutores, los Dres. Andrew Quest y Lisette Leyton, quienes con sus conocimientos y apoyo me guiaron a través de cada una de las etapas de este proyecto.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, por aceptarme como alumno del programa de Doctorado en Farmacología y por brindarme los recursos y herramientas imprescindibles para el desarrollo de esta investigación.

A los académicos de la comisión evaluadora de este trabajo, quienes con sus observaciones, correcciones y comentarios contribuyeron inmensamente a enriquecer mi formación durante el desarrollo de esta tesis.

A los miembros del Laboratorio de Comunicaciones Celulares: estudiantes, investigadores postdoctorales y apoyo técnico, quienes, con su compañía y buen humor alegraron mis días en la Facultad de Medicina y me ayudaron siempre que lo necesité. En particular, agradezco los miembros del “Team Exosomas” del laboratorio: América Campos, Ricardo Huilcamán, María Fernanda González y Sofía Sanhueza, por su excelente disposición para cooperar y debatir sobre nuestro tema de investigación.

A la Dra. América Campos, quien fué mi tutora en el laboratorio, a quien admiro por su entusiasmo y pasión por la investigación sobre las vesículas extracelulares.

A la Dra. Natalia Díaz, por todos sus sabios consejos e inmenso soporte emocional durante mis primeros meses en el laboratorio.

A los colegas Antonio Hidalgo y Pedro Novoa, con quienes tuve el placer de compartir conversaciones y vivencias durante los almuerzos en el “Pechi” y los cafés en la Facultad.

A las Dras. Paula Díaz y Lorena Oróstica, quienes me brindaron su ayuda y enseñanzas durante las amenas conversaciones que compartimos.

Al Dr. Javier Romero, quien con su desinteresada amistad siempre ha estado dispuesto a darme su consejo tanto en el ámbito académico como personal.

A mis antiguos maestros, mi cotutora durante la tesis de pregrado en la UC, la Dra. Flavia Zacconi y mi profesor de Biología durante la enseñanza media, el profesor Álvaro Castro. Sin su apoyo durante esas etapas de mi formación jamás me habría atrevido a convertirme en lo que intento ser ahora.

A Alexandra Elbakyan, quien a través de su proyecto Sci-Hub permite la difusión del conocimiento científico y me brindó acceso a muchos artículos académicos, los cuales enriquecieron enormemente el estado del arte y la discusión de este trabajo.

A mi pareja, quien deseo que sea mi compañera de la vida, Rayen Valdivia, con quien he compartido todas las penas y las alegrías desde hace más de 5 años. Eres el pilar fundamental en mi vida, me llena de dicha compartir cada segundo de mi vida con una mujer tan maravillosa y altruista como tú.

A mi madre, Clara Ema, quien ya no está conmigo a causa del cáncer. Quiero agradecerte por darme la vida, por todo el infinito amor y enseñanzas que me entregaste. Todo lo que soy y lo que llegaré a ser te lo debo, guardo los recuerdos de todo lo que vivimos como un tesoro.

Por último, pero no ello menos importantes, quiero agradecer a mis perros: Piridina “Ignacia” y Vicarious “Ernesto”, que me acompañaron durante todos los días y noches que tardé en elaborar y corregir este manuscrito. Mas que mascotas los amo como mis hijos.

Esta tesis de Doctorado se realizó en el Laboratorio de Comunicaciones Celulares del Centro de Estudios Avanzados de Enfermedades Crónicas (ACCDiS) y el Centro de estudios en Ejercicio, Metabolismo y Cáncer (CEMC) del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile gracias a los siguientes financiamientos:

Financiamiento otorgado al Dr. Andrew Quest.

FONDECYT 1170925 y 1210644

FONDAP 15130011

Financiamiento otorgado a la Dra. Lisette Leyton

FONDECYT 1150744 y 1200836

FONDAP 15130011

Financiamiento otorgado a Renato Burgos

Beca ANID (Ex Conicyt) para estudios de Doctorado Nacional n° 21200147, periodo 2020.

Beneficios Complementarios de Doctorado Nacional: Gastos Operacionales del Proyecto de Tesis Doctoral n° 21200147, año 2020

Beneficios Complementarios de Doctorado Nacional: Extensión de Beca para Redacción de Tesis Doctoral n° 21200147, año 2021 (6 meses).

**PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS ORIGINADAS DE
ESTA TESIS**

PUBLICACIONES:

Campos A, **Burgos-Ravanal R**, González MF, Huilcaman R, Lobos González L, Quest AFG. Cell Intrinsic and Extrinsic Mechanisms of Caveolin-1-Enhanced Metastasis. *Biomolecules*. 2019 Jul 29;9(8):314. doi: 10.3390/biom9080314.

Burgos-Ravanal R, Campos A, Díaz-Vesga MC, González MF, León D, Lobos-González L, Leyton L, Kogan MJ, Quest AFG. Extracellular Vesicles as Mediators of Cancer Disease and as Nanosystems in Theranostic Applications. *Cancers (Basel)*. 2021 Jul 2;13(13):3324. doi: 10.3390/cancers13133324.

TRABAJOS EN PREPARACIÓN:

Campos A*, **Burgos-Ravanal R***, Huilcamán R, González MF, Díaz J, Cáceres Verschae A, Silva V, Carrasco M, Guevara F, Varas-Godoy M, Leyton L, Lobos-González L, Quest A.F.G. Caveolin-1-containing extracellular vesicles promote malignant traits depending on the presence of extracellular matrix proteins.

*Equal contribution as first authors.

Campos A, Simón L, **Burgos-Ravanal R**, Huilcaman R, González MF, Salomon C, Lobos-Gonzalez L., Quest A.F.G. Caveolin-1-containing extracellular vesicles isolated from metastatic breast cancer cells by different methods are enriched in proteins associated with adhesion, migration, and invasion.

PRESENTACIONES A CONGRESOS:

CONGRESOS NACIONALES

POSTER: The presence of Cyr61 in EVs with caveolin-1 increases cell migration / invasion by activation of the $\alpha V\beta 3$ integrin in breast cancer cells. **Burgos R.**, Campos A., Diaz N, Leyton L, Quest A. F. G. Nanotechnology in Diagnosis and Treatment of Cancer Symposium, 1 de octubre de 2018, Santiago, Chile.

CONGRESOS INTERNACIONALES

POSTER: Breast cancer extracellular vesicles with caveolin-1 increase cell migration/invasion of recipient cells possibly by a mechanism involving the adhesion protein Cyr61. **Renato Burgos**, America Campos, Natalia Diaz-Valdivia, Manuel Varas-Godoy, Lisette Leyton, Andrew Quest. EMBO Workshop: Caveolae and Nanodomains, 12 - 16 de mayo de 2019, Le Pouliguen, Francia.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	8
ÍNDICE DE FIGURAS	11
ÍNDICE DE TABLAS	13
Abreviaturas	14
RESUMEN	17
ABSTRACT	20
1 – INTRODUCCIÓN	23
A – Cáncer de mama	23
B – Caveolina-1	24
C – Rol de Caveolina-1 en cáncer	26
E – Caveolina-1 en vesículas extracelulares	27
F – Relación entre Tenascina C y Caveolina-1	29
G – Tenascina C	30
H – Integrina $\alpha\beta 3$, péptidos RGD y anticuerpos bloqueantes	31
I – Señalización celular a través de vesículas extracelulares	33
RESUMEN DE LOS ANTECEDENTES	35
HIPÓTESIS	36
OBJETIVO GENERAL	38
OBJETIVOS ESPECIFICOS	38
2 – METODOLOGÍA	39
A – Cultivo de líneas celulares	43
B – Transducción lentiviral	44
C – Preparación de suero fetal bovino libre de EVs	45

D – Aislamiento de EVs	45
E – Análisis de EVs mediante seguimiento de nanopartículas (NTA)	46
F – Microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM).....	46
G – Purificación y cuantificación de proteínas	46
H – Western Blot	47
I – Pretratamiento y tratamiento de células T-47D y MDA-MB-231 con EVs	48
J – Marcaje fluorescente de EVs.....	49
K – Ensayo de internalización de EVs.....	49
L – Ensayo de migración	50
M – Ensayo de invasión.....	50
N – Ensayo de migración transendotelial	51
Ñ – Determinación de la localización de proteínas en EVs.....	51
O – Ensayo de formación de redes vasculares.....	51
P – Ensayo de viabilidad celular.....	52
Q – Análisis proteómico de las EVs mediante Espectrometría de Masas (LC-ESI-MS/MS)	52
R – Análisis estadístico.....	53
3 – RESULTADOS	54
Objetivo Específico 1: Determinar el efecto de TNC contenida en vesículas extracelulares de células de cáncer de mama que expresan CAV1, en la migración, invasión y migración transendotelial de células de cáncer de mama.	54
1.1 Silenciamiento de TNC en células MDA-MB-231	54
1.2 Aislamiento y caracterización de EVs	57
1.3 Evaluación de la migración, invasión y migración transendotelial de células de cáncer de mama pretratadas con EVs con y sin TNC	60
1.4 Evaluación de la migración e invasión de células de cáncer de mama tratadas con EVs con y sin TNC.....	63

Objetivo Específico 2: Estudiar si la captación de EVs depende de TNC contenida en las EVs y de integrina $\alpha\beta3$ en las células de cáncer de mama	65
2.1 Estudio de la captación de EVs con y sin TNC en células MDA-MB-231	65
2.2 Efecto de un anticuerpo bloqueante de integrina $\alpha\beta3$ y de un péptido con el motivo RGD en la captación de EVs en células MDA-MB-231.....	67
Objetivo Específico 3: Evaluar si TNC contenida en las EVs de células de cáncer de mama induce la migración mediante la activación de integrina $\alpha\beta3$	71
3.1 Estudio de la migración dependiente de integrinas en células MDA-MB-231 estimuladas con EVs con y sin TNC.....	71
3.2 Estudio de la localización de TNC y CAV1 en las EVs de células MDA-MB-23173	
Objetivo Específico 4: Determinar la contribución de TNC en las EVs de células de cáncer de mama a la formación de redes vasculares <i>in vitro</i>	76
4.1 Ensayo de formación de redes vasculares en células EA.hy926 estimuladas con EVs con y sin TNC	76
4 – DISCUSIÓN.....	78
5 – CONCLUSIONES.....	90
6 – REFERENCIAS	92
7 – ANEXO	99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la estructura de CAV1 y la formación de la caveola.	25
Figura 2. Modelo de la biogénesis de las vesículas extracelulares.....	28
Figura 3. Diagrama esquemático de la estructura de TNC.....	31
Figura 4. Péptido GRGDNP.	33
Figura 5. Mecanismos de captación y señalización celular a través de vesículas extracelulares.....	34
Figura 6. Modelo de trabajo propuesto.....	37
Figura 7. Selección por fluorescencia de las células MDA-MB-231 transducidas de forma estable con shARN contra Luciferasa (shLUC) o contra TNC (shTNC).	55
Figura 8. Nivel de TNC en las células MDA-MB-231 transducidas de forma estable con shARN contra Luciferasa (shLUC) y contra TNC (shTNC).	56
Figura 9. Estabilidad del silenciamiento de TNC en las células MDA-MB-231.	56
Figura 10. TNC es necesaria para la migración de células de cáncer de mama.	57
Figura 11. Análisis de seguimiento de nanopartículas de las EVs de células MDA-MB-231.	58
Figura 12. Microscopía electrónica de transmisión y barrido de las EVs de células MDA-MB-231.....	59
Figura 13. Caracterización de proteínas de las EVs de células MDA-MB-231 mediante western blot.	59
Figura 14. El pretratamiento con EVs de células MDA-MB-231 que tienen TNC aumenta la migración, invasión y migración transendotelial de las células MDA-MB-231.	61
Figura 15. El pretratamiento con EVs de células MDA-MB-231 que tienen TNC aumenta la migración e invasión de las células T-47D.....	62
Figura 16. Medio condicionado sin EVs no aumenta la migración e invasión de células MDA-MB-231.....	63

Figura 17. El tratamiento <i>in situ</i> con EVs de células MDA-MB-231 que tienen TNC aumenta la migración de las células de cáncer de mama.	64
Figura 18. El tratamiento <i>in situ</i> con EVs de células MDA-MB-231 tiene diferentes efectos sobre la invasión de las células de cáncer de mama.	65
Figura 19. El marcaje con PKH67 de EVs de las células MDA-MB-231 no modifica la distribución del tamaño de partícula.	66
Figura 20. Captación de EVs en células MDA-MB-231.	67
Figura 21. La captación de EVs en células MDA-MB-231 WT depende de integrina $\alpha v \beta 3$	69
Figura 22. Los inhibidores de integrinas no reducen la viabilidad de las células MDA-MB-231 WT.	70
Figura 23. La inhibición farmacológica de integrinas previene el aumento de la migración causado por las EVs con TNC.	72
Figura 24. TNC y CAV1 están localizadas en el interior de las EVs de las células MDA-MB-231.	74
Figura 25. El tratamiento de las EVs con tripsina suprime el aumento de la migración de las células de cáncer de mama.	75
Figura 26. TNC contenida en las EVs de células MDA-MB-231 aumenta la formación de redes vasculares <i>in vitro</i> de las células EA.hy926.	77
Figura 27. Modelo esquemático resumen de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis.	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Lista de reactivos utilizados	39
Tabla 2: Lista de anticuerpos utilizados en Western Blot	48

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
APS	Persulfato de amonio
BAL	Benzamidina/Antipaína/Leupeptina
BSA	Albúmina de suero bovino
CAV1	Caveolina-1
CTGF	Factor de crecimiento del tejido conjuntivo
Cyr61	Inductor angiogénico rico en cisteína 61
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EGTA	Ácido etilenglicol-bis (β -aminoetil éter) -N, N, N', N'-tetraacético
EVs	Vesículas extracelulares
EZ-ECL	Kit de detección de quimioluminiscencia para HRP
FAK	Quinasa de adhesión focal
FBG	Fibrinógeno
FN	Fibronectina
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
HRECs	Células endoteliales retinianas humanas
HUVECs	Células endoteliales de la vena umbilical humanas
h	Hora

ILV	Vesículas intraluminales
IL-6	Interleucina-6
kDa	Kilodalton
MEFs	Fibroblastos embrionarios de ratón
MVE	Endosoma multivesicular
min	Minuto
MLD	Metionina-lisina-ácido aspártico
ml	Mililitro
MMP-9	Metaloproteinasa de matriz extracelular 9
MSC	Células estromales mesenquimales
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
nm	Nanómetro
mARN	Ácido ribonucleico mensajero
NaCl	Cloruro de sodio
NTA	Análisis de nanoseguimiento
OPN	Osteoponina
OVA	Ortovanadato de sodio
PBS	Tampón fosfato salino
PDAC	Adenocarcinoma ductal pancreático
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PIPES	Ácido 1,4-piperazindiestanosulfónico
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

RGD	Arginina-glicina-ácido aspártico
s	Segundo
SDS	Dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
shCAV1	Horquilla de ARN dirigida contra Caveolina-1
shC	Horquilla de ARN dirigida contra Luciferasa
shLUC	Horquilla de ARN dirigida contra Luciferasa (2)
shTNC	Horquilla de ARN dirigida contra Tenascina C
TEM	Transición epitelio-mesénquima
TNC	Tenascina C
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
Tween	Polisorbato 20
WT	<i>Wild Type</i>
μ l	Microlitro

RESUMEN

El cáncer de mama es uno de los tipos de cáncer de mayor prevalencia y mortalidad a nivel mundial. El desarrollo de la metástasis es responsable del 90% de las muertes asociadas a este cáncer. Durante el desarrollo de la metástasis, las células de cáncer adquieren varias características biológicas, entre ellas aumentan la migración/invasión e inducen la angiogénesis. Caveolina-1 (CAV1) es una proteína que promueve la migración, invasión y el desarrollo de la metástasis de las células de cáncer de mama. La línea celular de cáncer de mama humano de alto potencial metastásico MDA-MB-231, expresa altos niveles de CAV1 y produce vesículas extracelulares (EVs) que contienen CAV1. Las EVs son estructuras delimitadas por bicapas lipídicas que se liberan desde las células y transfieren moléculas bioactivas de una célula a otra, modificando el comportamiento de las células receptoras, contribuyendo así a la progresión del cáncer. Las EVs con CAV1 promueven la migración e invasión de las células de cáncer de mama y se ha demostrado que hay proteínas relacionadas a procesos de adhesión biológica, entre ellas Tenascina C (TNC), que cosegregan con CAV1 en las EVs de las células MDA-MB-231. TNC aumenta la migración de las células de cáncer y promueve características proangiogénicas en células endoteliales. TNC ha sido vinculada con mecanismos moleculares que promueven la motilidad celular a través de la activación de integrina $\alpha\beta3$. Las integrinas son receptores celulares que median la adhesión a la matriz extracelular, regulan la migración celular y también el desarrollo de la angiogénesis. Se ha reportado que integrina $\alpha\beta3$ regula positivamente la captación de las EVs por las células MDA-MB-231. La activación de integrina $\alpha\beta3$ puede ser inhibida mediante el uso de péptidos que contienen el motivo RGD o anticuerpos bloqueantes. Hasta la fecha, se desconoce si TNC contenida en las EVs de células MDA-MB-231 es responsable del aumento de la migración e invasión de las células de cáncer de mama o si promueve características proangiogénesis en células endoteliales. Tampoco se ha estudiado si la captación de las EVs puede ser inhibida mediante el bloqueo farmacológico de la integrina $\alpha\beta3$. Para responder estas interrogantes proponemos la siguiente hipótesis: **Las vesículas extracelulares de células de cáncer de mama que contienen CAV1 y TNC aumentan la migración e invasión de las células de cáncer a través de la captación de las vesículas dependiente de integrina $\alpha\beta3$ y promueven la formación de redes vasculares en células endoteliales.** Para abordar la hipótesis se plantearon los siguientes objetivos específicos: (i)

determinar el efecto de TNC contenida en las EVs de células de cáncer de mama que expresan CAV1, en la migración, invasión y migración transendotelial de células de cáncer de mama; (ii) estudiar si la captación de EVs depende de TNC contenida en las EVs y de integrina $\alpha\beta3$ en las células de cáncer de mama; (iii) evaluar si TNC contenida en las EVs de células de cáncer de mama induce la migración mediante la activación de integrina $\alpha\beta3$; y finalmente (iv) determinar la contribución de TNC en las EVs de células de cáncer de mama a la formación de redes vasculares *in vitro*. Se establecieron las sublíneas celulares con expresión reducida de TNC (MDA-MB-231 shTNC) y su control (MDA-MB-231 shLUC), a partir de la línea celular MDA-MB-231 WT. Luego, se aislaron y caracterizaron las EVs: se demostró que las EVs estaban enriquecidas en vesículas de <200 nm de diámetro y se demostró la presencia de marcadores proteicos de EVs. Además, se confirmó que el silenciamiento de TNC en las células MDA-MB-231 shTNC también redujo la incorporación de TNC en sus EVs. Para estudiar el efecto biológico de TNC en las EVs se evaluaron parámetros de migración e invasión de las células de cáncer de mama estimuladas con estas EVs. Se demostró que el pretratamiento de las células MDA-MB-231 WT con las EVs con TNC aumentó la migración, invasión y migración transendotelial de las mismas células, así como la migración e invasión de la línea celular de cáncer de mama no metastásico T-47D. El tratamiento usando las EVs con TNC aumentó la migración, pero no la invasión de las células MDA-MB-231. Análogamente, estos EVs aumentaron la migración de las células T-47D, mientras que todos los EVs, independiente del contenido de TNC, aumentaron la invasión de las células T-47D. A continuación, se estudió la captación de las EVs con un marcaje fluorescente en las células MDA-MB-231. La captación de las EVs durante una incubación de 24 h es alta (superior al 85%) y no depende de TNC contenida en las EVs. Por otra parte, el uso de inhibidores farmacológicos de integrinas tuvo efectos variables sobre la captación de las EVs: el anticuerpo bloqueante de integrina $\alpha\beta3$ redujo la captación de las EVs, mientras que el péptido RGD no mostró efectos. Luego, se evaluó si TNC en las EVs podría inducir la migración celular a través de su interacción con integrina $\alpha\beta3$. Se evidenció que el aumento de la migración celular causado por el tratamiento con las EVs con TNC requiere de la presencia de fibronectina. El uso de ambos inhibidores farmacológicos de integrinas previno el aumento de la migración de las células tratadas con las EVs que contienen TNC. En estos experimentos el péptido RGD fue mucho más eficiente, lo que sugiere que estaría

bloqueando mecanismos adicionales dependientes de integrinas relevantes para la migración en fibronectina y no relacionados con la captación de EVs. Se demostró también que TNC y CAV1 están localizadas en el lumen de las EVs, por lo que TNC contenida en las EVs no puede interactuar con integrina $\alpha\beta3$ sin que haya un proceso previo de captación en la célula receptora. No se logró dilucidar el mecanismo por el cual las EVs con TNC aumentan la migración celular. Finalmente, el estudio del efecto proangiogénico de las EVs demostró que solamente las EVs con TNC aumentan la formación de redes vasculares en las células endoteliales. En conjunto, estos resultados respaldan el rol de TNC contenida en las EVs de células de cáncer de mama fomentando la adquisición de características promigratorias y angiogénicas en las células receptoras dependiente de la integrina $\alpha\beta3$. Además, sugieren que la función de CAV1 es regular la incorporación de factores promotores del desarrollo del cáncer en las EVs.

ABSTRACT

Breast cancer is one of the types of cancer with the highest prevalence and mortality worldwide. The development of metastasis is responsible for 90% of deaths associated with this cancer and during this process, cancer cells acquire several biological characteristics, including increased migration/invasion and the ability to induce angiogenesis. Caveolin-1 (CAV1) is a protein that promotes migration, invasion and metastasis of breast cancer cells. Indeed, the highly metastatic human breast cancer cell line MDA-MB-231, expresses high levels of CAV1 and produces extracellular vesicles (EVs) containing CAV1. EVs are vesicular structures limited by a lipid bilayer that are released by cells and transfer bioactive molecules from one cell to another, modifying the behavior of recipient cells, thus contributing to cancer progression. EVs with CAV1 promote the migration and invasion of breast cancer cells in a manner dependent on the presence of CAV1. Also, proteins related to biological adhesion processes, including, but not limited to Tenascin C (TNC), were shown to co-segregate with CAV1 in the EVs of MDA-MB-231 cells. TNC reportedly increases cancer cell migration and promotes pro-angiogenic features in endothelial cells. Interestingly, TNC function has been suggested to promote cell motility by activating integrin $\alpha\beta3$. Integrins are cellular receptors that mediate adhesion to the extracellular matrix, regulate cell migration and angiogenesis. It has been reported that $\alpha\beta3$ integrin positively regulates the uptake of EVs by MDA-MB-231 cells. Activation of $\alpha\beta3$ integrin can be inhibited using peptides containing the RGD motif or blocking antibodies. To date it remains unknown whether TNC contained in EVs of MDA-MB-231 cells is responsible for the increased migration and invasion of breast cancer cells or whether it promotes angiogenesis of endothelial cells. Moreover, whether the uptake of EVs can be inhibited pharmacologically by blocking integrin $\alpha\beta3$ is also unknown. To answer these questions, we propose the following hypothesis: **Extracellular vesicles from breast cancer cells that contain CAV1 and TNC increase cancer cell migration and invasion through $\alpha\beta3$ integrin-dependent vesicle uptake and promote the formation of vascular networks by endothelial cells.** To address the hypothesis, the following specific objectives were defined: (i) to determine the effect of TNC contained in the EVs from breast cancer cells expressing CAV1 on the migration, invasion and transendothelial migration of breast cancer cells; (ii) to study whether EV uptake depends on the TNC contained in EVs and on $\alpha\beta3$ integrin in

recipient breast cancer cells; (iii) to evaluate whether TNC contained in the EVs of breast cancer cells increases migration of recipient cells by activating the integrin $\alpha\beta3$; and finally (iv) to determine the contribution of TNC in EVs to the formation of vascular networks by endothelial cells *in vitro*. Cell sublines with reduced expression of TNC (MDA-MB-231 shTNC) or not (control MDA-MB-231 shLUC) were generated from the MDA-MB-231 WT cell line. Then, we proceeded to isolate and characterize the EVs produced by these cell lines. EVs were shown to be enriched in vesicles <200 nm in diameter and the presence of protein markers characteristic of EVs was observed. Furthermore, we confirmed that silencing of TNC in MDA-MB-231 shTNC cells also reduced incorporation of TNC into EVs. To study the biological effects of TNC in EVs, their ability to promote migration and invasion in recipient cells was evaluated. Pre-treatment of MDA-MB-231 WT cells with the EVs containing TNC increased the migration, invasion and transendothelial migration of the same cells, as well as migration and invasion of the non-metastatic breast cancer cell line T-47D. Treatment with TNC-containing EVs increased migration, but not the invasion of MDA-MB-231. Analogously, these EVs increased the migration of T-47D cells, while all EVs independent of the TNC content, increased invasion of T-47D cells. Next, the uptake of fluorescently labeled EVs by MDA-MB-231 cells was studied. EV uptake after incubation for 24 h was high (greater than 85 %) and did not depend on the presence of TNC in the EVs. On the other hand, the use of pharmacological inhibitors of integrins had varying effects on EV uptake. The $\alpha\beta3$ integrin blocking antibody reduced EVs uptake, while the RGD peptide had no effect. Then, we evaluated whether the ability of TNC in EVs to induce cell migration depended on interaction with the integrin $\alpha\beta3$. We observed that the increase in cell migration observed following treatment with EVs containing TNC required the presence of fibronectin. The application of either the antibody or peptide inhibitor prevented the increase in cell migration observed following treatment with EVs containing TNC. In these experiments, the RGD peptide inhibitor was much more efficient, suggesting that it was blocking additional integrin-dependent mechanisms relevant to migration on fibronectin not related to EV uptake. Also, TNC and CAV1 were found to be localized in the lumen of EVs, suggesting that TNC contained in EVs does not interact directly with $\alpha\beta3$ integrin, but rather requires prior EV uptake by recipient cells. Unfortunately, we were unable to elucidate the precise mechanism by which EVs containing TNC increase migration in recipient cells.

Finally, only EVs containing TNC increased the formation of vascular networks by endothelial cells. Taken together, these results support the notion that TNC contained in EVs of metastatic breast cancer cells promotes the migration and invasion of recipient cancer cells via the integrin $\alpha\beta3$ and angiogenesis of endothelial cells, although in the latter case the relevance of the integrin $\alpha\beta3$ remains to be defined. Moreover, these results suggest that the function of CAV1 in EV biogenesis in metastatic cancer cells is to regulate the incorporation of cancer-promoting components into EVs.

1 – INTRODUCCIÓN

A – Cáncer de mama

Durante los últimos 5 años, 7,8 millones de mujeres fueron diagnosticadas con cáncer de mama, lo que lo convierte en el tipo de cáncer de mayor prevalencia en el mundo. En el año 2020, el cáncer de mama fue responsable de 685.000 muertes en todo el mundo [1]. El cáncer de mama en mujeres se ha caracterizado por una alta incidencia en países desarrollados y un aumento de la incidencia en países en vías de desarrollo, como resultado de cambios demográficos y aumento en la prevalencia de factores de riesgo hormonales y relacionados con estilos de vida, tales como el aumento de la edad de las mujeres en su primer parto y un largo tiempo de exposición al estrógeno, producto de menarquia temprana y menopausia tardía, entre otros [2].

En Chile, es también el tipo de cáncer más frecuente entre las mujeres, donde se ha estimado que el riesgo de desarrollar cáncer de mama para las mujeres chilenas es del 3% al 3,5% [3]. En el año 2020, en Chile se diagnosticaron 5.331 nuevos casos de cáncer de mama, lo que corresponde a un 9.8% del total de nuevos casos reportados. Ese mismo año se informaron 1.674 muertes por cáncer de mama, lo que corresponde a un 5.9% del total de muertes por cáncer en el país [4].

El cáncer se caracteriza inicialmente por el crecimiento descontrolado de un tumor primario, que luego es seguido por la diseminación de células cancerosas a los tejidos circundantes y secundarios en un proceso denominado metástasis [5]. La transformación de células normales en células de cáncer y el desarrollo de un tumor implica la adquisición de varias características biológicas distintivas, entre las que se incluyen: mantener la señalización proliferativa, evadir los supresores del crecimiento, resistir a la muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa, inducir la angiogénesis y activar invasión y metástasis [6]. Actualmente, se estima que la metástasis es la principal causa de mortalidad por cáncer y, como tal, responsable de aproximadamente el 90% de las muertes por cáncer [5]. Los sitios más comunes de metástasis del cáncer de mama incluyen los huesos, el hígado, los pulmones y el cerebro [7].

Teniendo en cuenta esto, es importante notar que la expresión de la proteína Caveolina-1 (CAV1) está involucrada tanto en la adquisición de los rasgos característicos de las células de cáncer como en el desarrollo de la metástasis [8, 9].

B – Caveolina-1

CAV1 es una proteína de 22 kDa codificada por el gen *CAV1*, localizada en las caveolas, mitocondrias, retículo endoplásmico y en exosomas [10, 11]. La secuencia de CAV1 contiene un dominio hidrofóbico central (residuos 102-134), que adopta una conformación parecida a una horquilla la cual se inserta en la capa interior de la membrana plasmática y por ello sus extremos carboxilo y amino terminales se posicionan en el citoplasma. Una secuencia modular, denominada "dominio de andamiaje de Caveolina" (residuos 82-101) está situada adyacente al dominio hidrófobo, hacia la región amino-terminal, y se requiere para la homo y heterooligomerización, así como para la interacción con proteínas de señalización [12]. En la región carboxilo terminal, CAV1 contiene tres residuos de cisteína palmitoilados que son importantes para la oligomerización, pero no para su transporte o localización en las caveolas [13]. Se ha determinado una secuencia mínima de 10 aminoácidos (residuos 46-55) en la región amino terminal de CAV1 que se requiere para la localización de la proteína en la parte trasera de las células de fibroblastos embrionarios de ratón que están migrando y también para la formación de las caveolas [14]. La oligomerización de las caveolinas genera grandes complejos moleculares y es esencial para la biogénesis de las caveolas [15, 16].

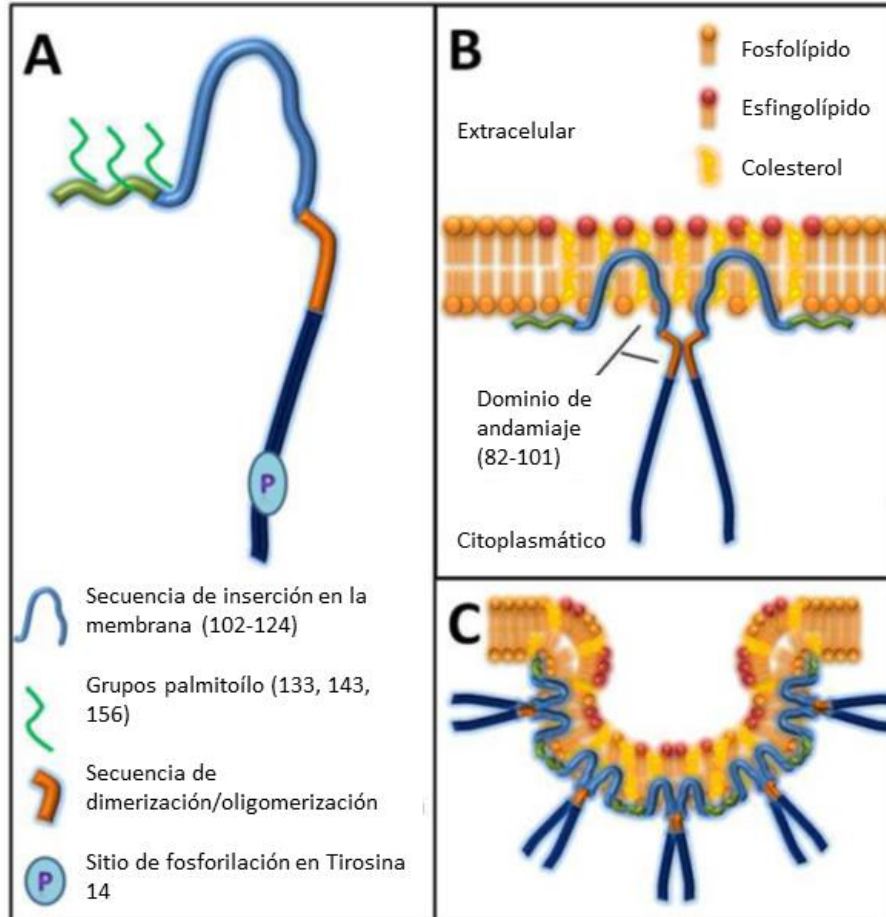


Figura 1. Esquema de la estructura de CAV1 y la formación de la caveola. A) Distintos sitios, dominios y residuos de aminoácidos relevantes para la función de CAV1. B) Esquema del anclaje de CAV1 formando un homodímero en la membrana plasmática en sitios ricos en colesterol y esfingolípidos. C) Estructura oligomérica de CAV1 en un microdominio de membrana que genera una pequeña invaginación llamada Caveola (50 – 100 nm). Imagen modificada de [17].

Existen 2 isoformas de CAV1 (CAV1 α y CAV1 β) las que derivan de la iniciación alternativa durante el proceso de traducción o son generadas a partir de distintos RNA mensajeros (mARNs) *in vivo* [12, 18]. CAV1 α está formada por los residuos 1-174 y CAV1 β por los residuos 34-174. Desde el punto de vista funcional la principal diferencia entre ambas isoformas es el hecho de que solo CAV1 α contiene un residuo de tirosina en la posición 14 que puede ser fosforilado por tirosinas quinasas no receptoras de la familia Src, como c-Src o c-Abl, en respuesta a un gran número de estímulos como insulina, factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), una molécula análoga de progesterona, estrés mecánico y estrés oxidativo [15]. Se ha descrito que la fosforilación

en la posición 14 en respuesta a un estímulo es dependiente del tipo celular. En los adipocitos, por ejemplo, la fosforilación de tirosina 14 de CAV1 se observa sólo en respuesta a la estimulación con insulina, pero no con EGF, PDGF, factor de necrosis tumoral α (TNF- α) o la interleucina-6 (IL-6) [9].

C – Rol de Caveolina-1 en cáncer

La función de CAV1 en la carcinogénesis ha sido desde hace muchos años un tema de intenso debate y la información disponible hasta ahora sugiere que la proteína puede actuar como un supresor de tumores o como promotor de metástasis, dependiendo del tipo celular. CAV1 regula múltiples procesos asociados con el desarrollo del cáncer, incluyendo la transformación celular, crecimiento tumoral, migración, metástasis, supervivencia y muerte celular, resistencia a múltiples fármacos y angiogénesis [19].

En este contexto, la función de CAV1 como promotor de tumores se ha evidenciado en el tejido prostático. En el tejido prostático normal CAV1 está ausente; sin embargo, la expresión de CAV1 aumenta tras la formación de tumores en modelos de ratón y en pacientes humanos [20], así como también promueve el crecimiento tumoral [21]. Por otra parte, en tejidos donde la formación de tumores está asociada a una pérdida inicial de CAV1, la reexpresión de la proteína en etapas posteriores del desarrollo del tumor se correlaciona con tumores de características más malignas [15]. En células de cáncer de colon seleccionadas por su resistencia al metotrexato o con un mayor potencial metastásico, los niveles de CAV1 están elevados con respecto a los detectados en las células de tipo *wild type* [22]. Además, la expresión de CAV1 aumenta en las células de cáncer de mama MCF7 resistentes a múltiples fármacos [23, 24].

Se ha demostrado que CAV1 activa a Rab5 y en consecuencia a Rac1, a través del reclutamiento del factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) Tiam1 en tres líneas celulares metastásicas [25]. El rol de CAV1 en la migración de células metastásicas se evaluó al reducir los niveles de CAV1 endógena en células MDA-MB-231 y expresándola ectópicamente en células de melanoma de ratón B16-F10. La disminución de la expresión de CAV1 en células MDA-MB-231 redujo la migración y el recambio de las adhesiones focales en una secuencia de eventos que implican la fosforilación del residuo de tirosina-14 de CAV1 y la activación de Rac-1. En cambio, el aumento de la expresión de CAV1 en células B16-

F10 produjo los efectos contrarios. Además, se demostró que el tratamiento de las células MDA-MB-231 con el inhibidor de las Src quinasas PP2 redujo la fosforilación de CAV1 en la tirosina-14 y la migración celular [26]. En células humanas de cáncer de mama metastásico MDA-MB-231, CAV1 α está altamente expresada y fosforilada en la tirosina-14, en comparación con las células de cáncer no metastásicas [27]. Estos antecedentes evidencian la relevancia de CAV1 y de su fosforilación en la tirosina 14, mediada por Src quinasas, en la señalización intracelular que regula la migración de células de cáncer.

CAV1 no solamente se ha identificado como un componente intracelular de las células tumorales, sino que se ha evidenciado su presencia en las vesículas extracelulares (EVs) derivadas de estas células, las que transportan moléculas que favorecen la transición epitelio-mesénquima (TEM), la migración e invasión de las células receptoras, que contribuyen a la remodelación del estroma y a la formación del nicho premetastásico [28].

E – Caveolina-1 en vesículas extracelulares

Aunque el término vesículas extracelulares (EVs) se usa actualmente para referirse a todas las vesículas de membrana secretadas, éstas están compuestas por un conjunto de poblaciones con características heterogéneas. Las EVs se pueden dividir ampliamente en dos categorías principales: exosomas y microvesículas [29]. El término exosoma se adoptó para referirse a las vesículas de membrana (30-100 nm de diámetro) liberadas por los reticulocitos durante la diferenciación [30]. En el interior de la células, los exosomas son vesículas intraluminales (ILV) formadas por la gemación hacia dentro de la membrana endosomal durante la maduración de los endosomas multivesiculares (MVE), que son intermedios dentro del sistema endosomal y secretados por la fusión de MVE con la membrana celular [29]. Por otra parte, las microvesículas tienen un diámetro que varían de 50 a 1000 nm, pero pueden ser incluso de hasta 10 μ m en el caso de los oncosomas (microvesículas provenientes de células de cáncer). A diferencia de los exosomas, las microvesículas se generan por la gemación y fisión hacia afuera de la membrana plasmática y la posterior liberación de vesículas en el espacio extracelular [31] (Figura 2).

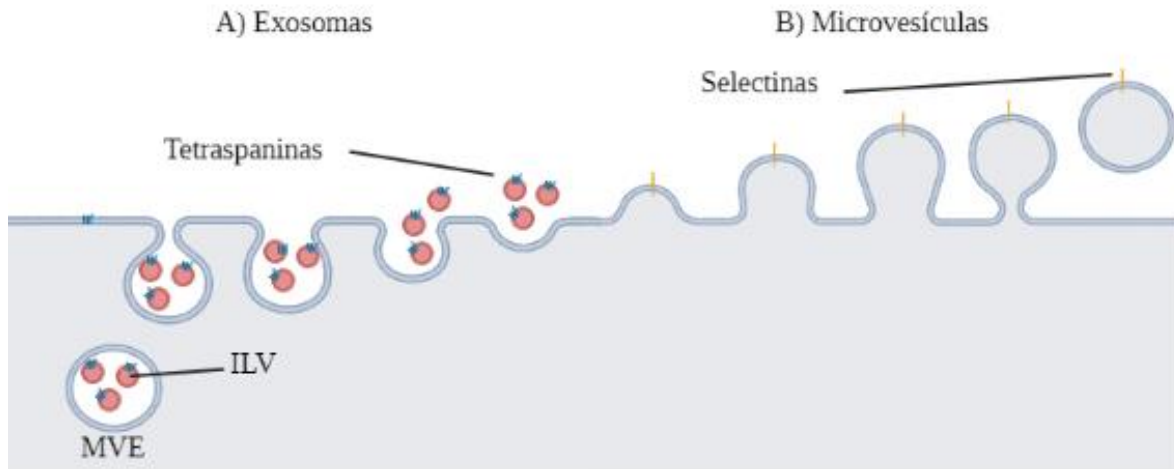


Figura 2. Modelo de la biogénesis de las vesículas extracelulares. Las vesículas extracelulares se pueden dividir ampliamente en dos categorías principales: exosomas y microvesículas. A) La invaginación de la membrana de los endosomas multivesiculares (MVE) forma las vesículas intraluminales (ILV). Los exosomas (que contienen tetraspaninas) son secretados cuando los MVE se fusionan con la superficie celular. B) Las microvesículas (que contienen selectinas) son formadas por la gemación a partir de la membrana plasmática [29].

Los exosomas son secretados por diferentes tipos de células en condiciones fisiológicas y también por células tumorales, donde se ha reportado que su liberación se incrementa considerablemente [32, 33]. Se ha evidenciado que los exosomas derivados de tumores humanos están implicados en la progresión de la enfermedad para permitir la iniciación tumoral, crecimiento y desarrollo de la metástasis [10, 33, 34]. Los exosomas pueden transferir moléculas bioactivas tales como proteínas, mRNA, así como ARN no codificantes de una célula a otra, dando lugar al intercambio de información genética y reprogramación de las células receptoras [33].

Los exosomas derivados de células metastásicas de carcinoma hepático que contienen CAV1 (mRNA y proteína) aumentaron la migración e invasión de células inmortalizadas de hepatocito no móviles [35]. Además, se ha reportado que la cantidad de exosomas con CAV1 es significativamente mayor en el plasma de pacientes con melanoma, en comparación con donantes sanos. CAV1 se detectó de forma abundante en los exosomas de las células humanas de melanoma Me501 *in vitro* mientras que no se detectó en extractos celulares o exosomas de células humanas no tumorales [10]. Los exosomas de células de cáncer de mama altamente metastásicas MDA-MB-231 aumentaron la migración de células receptoras,

evaluada a través de ensayos de cicatrización de heridas, en mayor grado que los exosomas de las células de cáncer de mama no metastásicas MCF-7 [36]. Cabe destacar que el nivel de expresión de CAV1 es mucho mayor en las células MDA-MB-231 que en las células MCF-7 [37]. Posteriormente, se demostró que las EVs de las células MDA-MB-231 que contienen CAV1 (MDA-MB-231 WT y shC) aumentan la migración e invasión de las células de cáncer de mama no metastásico T-47D. Además, las Evs de las células que contienen CAV1 aumentaron la invasión de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 WT, sin embargo, solo las Evs de las células WT aumentaron la migración en estas células. Finalmente, las Evs de las células con baja expresión de CAV1 (MDA-MB-231 shCAV1) no aumentaron la migración e invasión con respecto al nivel basal (sin tratamiento) de las células T-47D y MDA-MB-231 WT [38]. Estos antecedentes han evidenciado el rol de CAV1 contenida en Evs/exosomas, como promotor de la migración e invasión en células que son estimuladas con estas vesículas.

F – Relación entre Tenascina C y Caveolina-1

Se ha reportado una correlación entre los niveles de expresión de CAV1 y Tenascina C (TNC) en células de cáncer de mama. En líneas celulares con altos niveles de CAV1 (MDA-MB-231) la expresión de TNC es elevada, mientras que en células con menor nivel de expresión de CAV1 (MCF-7 y T-47D) el nivel de expresión de TNC también es menor [39]. Sin embargo, no hay estudios sobre esta correlación en muestras de tejidos humanos o animales.

Por otra parte, el análisis proteómico de las Evs de las células MDA-MB-231 demostró que entre los componentes que cosegregan con CAV1 en las Evs de las células con CAV1, se encuentran varias proteínas relacionadas con la adhesión biológica que no se encontraron en las Evs de las células sin CAV1. Estos componentes son: la proteína relacionada con Ras Rap-1A, S100 proteína de unión a calcio A9 (S100A9), factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF), el inductor angiogénico rico en cisteína 61 (Cyr61) y TNC. La presencia de Cyr61 y TNC se validaron mediante western blot en muestras de EVs de las células MDA-MB-231 WT y shC. Sin embargo, estos resultados no se correlacionaron completamente con el análisis proteómico, ya que se detectó S100A9 y CTGF en las EVs de células MDA-MB-231 shCAV1 [38]. Estudios posteriores mostraron que CAV1 y TNC están contenidos en las EVs de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs). Además, se evaluó la funcionalidad de estas EVs y se demostró que aumentan la TEM y la invasión de esferoides de células de

cáncer de mama [40]. Hasta la fecha no existen más publicaciones que informen sobre la relación entre estas 2 proteínas en EVs/exosomas.

G – Tenascina C

TNC es una proteína de matriz extracelular (ECM) multimodular hexamérica con varias formas moleculares que se producen mediante empalmes alternativos y modificaciones postraduccionales. En humanos la expresión de TNC está regulada presentando una distribución generalizada en tejidos embrionarios, mientras que en tejidos adultos se expresa de manera prominente solo en algunos nichos de células madres (folículos pilosos, criptas del intestino y médula ósea) y en tendones [41]. TNC se expresa *de novo* durante la cicatrización de heridas o en condiciones patológicas, como inflamación crónica y cáncer [42]. El análisis de la expresión de las isoformas de TNC en tejido mamario normal, hiperplásico y neoplásico indicó que la expresión de una isoforma truncada (pequeña) predomina en el tejido normal y las lesiones benignas; y la isoforma de longitud completa (grande) predomina en carcinomas invasores [43]. Además, se ha demostrado que esta isoforma truncada apoya la unión de las células, mientras que la isoforma completa es antiadhesiva [44].

El análisis inmunohistoquímico de muestras de tejido de mujeres con cáncer de mama mostró que la expresión de TNC en el estroma predice una peor supervivencia general [45]. La expresión de TNC promueve la supervivencia de las células de cáncer de mama circulantes y su colonización dentro del parénquima pulmonar *in vivo* [46]. Estudios *in vitro* demostraron que la reducción en el nivel de mRNA de TNC reduce la migración de la línea celular humana de cáncer de mama BT-474 [47] y la migración e invasión de las líneas celulares cáncer de páncreas humano Aspc-1 y de hámster PC-1.0 [48]. Por otra parte, el tratamiento con TNC, como proteína purificada, aumenta la expresión de MMP-9 en células de cáncer de mama murino [49], así como también la formación de redes vasculares en células retinales endoteliales humanas [50]. Un estudio inmunohistoquímico de muestras de tejido de glioblastoma multiforme mostró que un patrón de distribución perivascular de TNC correlaciona con una mayor densidad microvascular [51].

En cuanto a la presencia de TNC en EVs, estudios anteriores han demostrado el enriquecimiento selectivo de TNC en exosomas derivados de células metastásicas humanas

de cáncer colorrectal [52], así como su detección en exosomas de células de cáncer de páncreas de hámster y humano [48], y en muestras de fluido ductal pancreático de pacientes con adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) [53]. También se ha demostrado que TNC se secreta desde las células iniciadoras de tumores cerebrales vía exosomas, lo que conduce a la supresión de la respuesta de las células T afectando la inmunidad local y distal de los linfocitos T [54].

Se ha reportado que TNC es un ligando de los heterodímeros de integrina $\alpha 2/7/8/9\beta 1$ y $\alpha \beta 1/3/6$ [55]. TNC tiene una baja expresión en la mucosa intestinal normal y no displásica, pero se expresa de forma abundante en el estroma alrededor de las lesiones displásicas, que pueden desarrollar cáncer de colon. El análisis inmunohistoquímico mostró que TNC e integrina $\alpha \beta 3$ se coexpresan predominantemente en los vasos del estroma alrededor de lesiones displásicas. Las integrinas actúan como receptores para moléculas de adhesión celular a través del motivo arginina-glicina-ácido aspártico (RGD). Se han identificado dos sitios de unión de integrina en la estructura de TNC que contienen la secuencia RGD dentro de la repetición 3 de FNIII y en FBG C-terminal (Figura 3) [55].



Figura 3. Diagrama esquemático de la estructura de TNC. Se muestra el dominio de ensamblaje de tenascina N-terminal (TA), las repeticiones del factor de crecimiento epidérmico (EGF), las repeticiones del dominio de fibronectina tipo III (FNIII) y dominio de fibrinógeno (FBG). Las repeticiones FNIII empalmadas alternativamente A1 – D se muestran en negro. Modificado de [55].

Estos antecedentes muestran que TNC tiene un rol importante en la migración e invasión de células de cáncer; sin embargo, se sabe poco sobre el papel de TNC contenida en las EVs de las células de cáncer de mama humano, su posible interacción con receptores de superficie celular y su contribución a la progresión de este tipo de cáncer.

H – Integrina $\alpha \beta 3$, péptidos RGD y anticuerpos bloqueantes

Las integrinas son receptores celulares que median la adhesión a la ECM y regulan la migración celular, un proceso crucial en la invasión tumoral [56]. Recientemente, se ha

demostrado que integrina $\alpha\beta3$ es un factor muy relevante en la captación de las EVs en las células MDA-MB-231 [57]. Las interacciones de integrina $\alpha\beta3$ con otras proteínas incluyen su unión selectiva a proteoglicanos de heparán sulfato (HSPGs) localizados en la superficie celular. El ectodominio del núcleo proteico de Syndecan-1 participa directamente en la formación de un complejo de señalización que coopera con integrina $\alpha\beta3$ en las células MDA-MB-231 [58]. La endocitosis de integrinas da como resultado la captación celular coordinada de las EVs asociadas a integrina $\alpha\beta3$ y HSPGs [57].

Integrina $\alpha\beta3$ reconoce el motivo RGD en las proteínas de ECM y sus efectos pueden ser prevenidos por el uso de péptidos RGD, lo que resulta en una disminución de la migración e invasión celular [56]. Los venenos de serpiente son fuentes abundantes de proteínas de unión a integrinas ricas en cisteína, llamadas desintegrinas [59]. Las desintegrinas se pueden clasificar en tres grupos diferentes según el dominio tripéptido: arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), metionina-leucina-ácido aspártico (MLD) y arginina/lisina-treonina-serina (R/KTS). Algunas desintegrinas poseen una secuencia de tripéptidos diferente, pero relacionada, generalmente con el ácido aspártico conservado [60]. La mayoría de las desintegrinas RGD son inhibidores eficaces de integrina $\alpha\beta3$ en un rango nanomolar y pueden utilizarse como herramientas para comprender el papel de integrinas en varias enfermedades [61].

El tratamiento con Osteoponina (OPN), una proteína ligando de integrina $\alpha\beta3$, aumentó la migración de células estromales mesenquimales (MSC). El uso de un péptido bloqueante RGD y de un anticuerpo bloqueante de integrina $\alpha\beta3$ (ab78289) previnieron el aumento de la migración provocada por el tratamiento con OPN [62]. El pretratamiento de células de cáncer de colon y de próstata humano con el péptido RGD (GRGDNP) (Figura 4) en concentraciones micromolares inhibió la activación de la señalización intracelular dependiente de la activación de integrina $\alpha\beta3$ [63, 64]

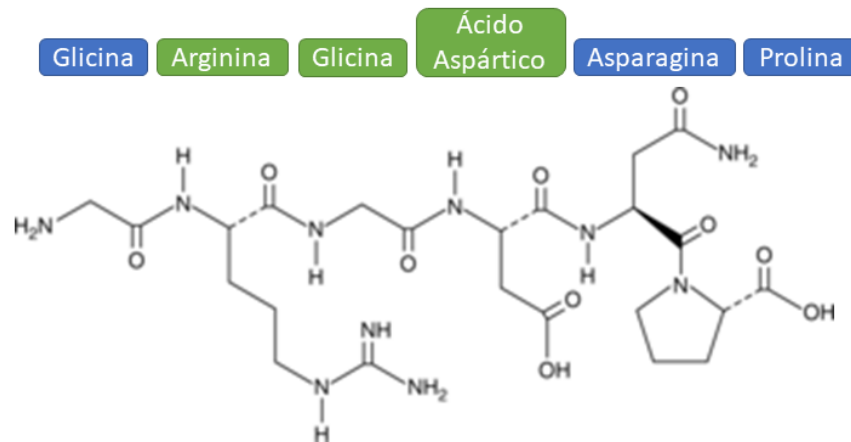


Figura 4. Péptido GRGDNP. Se muestra en la parte superior la secuencia de aminoácidos que lo componen, la secuencia Arginina-Glicina-Ácido Aspártico se destaca en color verde y en la parte inferior, la estructura química del hexapéptido.

Sin embargo, los medicamentos basados en RGD han mostrado resultados decepcionantes en los ensayos clínicos [56]. La cilengitida es un pentapéptido RGD cíclico que se testeó en ensayos clínicos. A pesar de los altos niveles de expresión de integrina $\alpha\beta3$ en tumores de tipo glioblastoma, la cilengitida no aumentó la supervivencia en un estudio de fase III en pacientes con diagnóstico reciente de este tipo de tumor. Se han sugerido como motivos de la falta de efecto de la cilengitida una farmacocinética desfavorable y un conocimiento insuficiente sobre los efectos biológicos del fármaco en la vasculatura tumoral [65].

Estos antecedentes evidencian el rol de integrina $\alpha\beta3$ en la migración de las células de cáncer, así como su importancia en el proceso de captación de las EVs por parte de la célula receptora. Sin embargo, hasta la fecha no se han reportado los efectos del bloqueo a través de una estrategia de tipo farmacológico de integrina $\alpha\beta3$ en el proceso de captación de las EVs.

I – Señalización celular a través de vesículas extracelulares

Las EVs pueden originar respuestas celulares sin la necesidad de ser internalizadas en una célula mediante 2 mecanismos: señalización soluble y yuxtacrina (Figura 5). La señalización soluble implica la proteólisis de un ligando que necesariamente se localiza en la superficie de la EV, mientras que la señalización yuxtacrina requiere la yuxtaposición de ligandos y receptores en las superficies de la EV y la célula diana, respectivamente. Por otra parte, las EVs pueden ser internalizadas en la célula mediante 4 mecanismos: fusión de membrana,

fagocitosis, macropinocitosis y endocitosis. La fagocitosis inevitablemente resulta en la fusión del fagosoma con los lisosomas y la degradación de su contenido [66]. Es más probable que la señalización soluble, la señalización yuxtacrina y la fusión de membrana finalicen con una respuesta celular, ya que los componentes de las EVs no entran directamente a la vía de degradación endosomal-lisosómica [66]. Sin embargo, no se ha reportado evidencia en la literatura que indique si TNC se posiciona en la superficie de las EVs para actuar como un ligando soluble o a través de señalización yuxtacrina interactuando con integrinas.

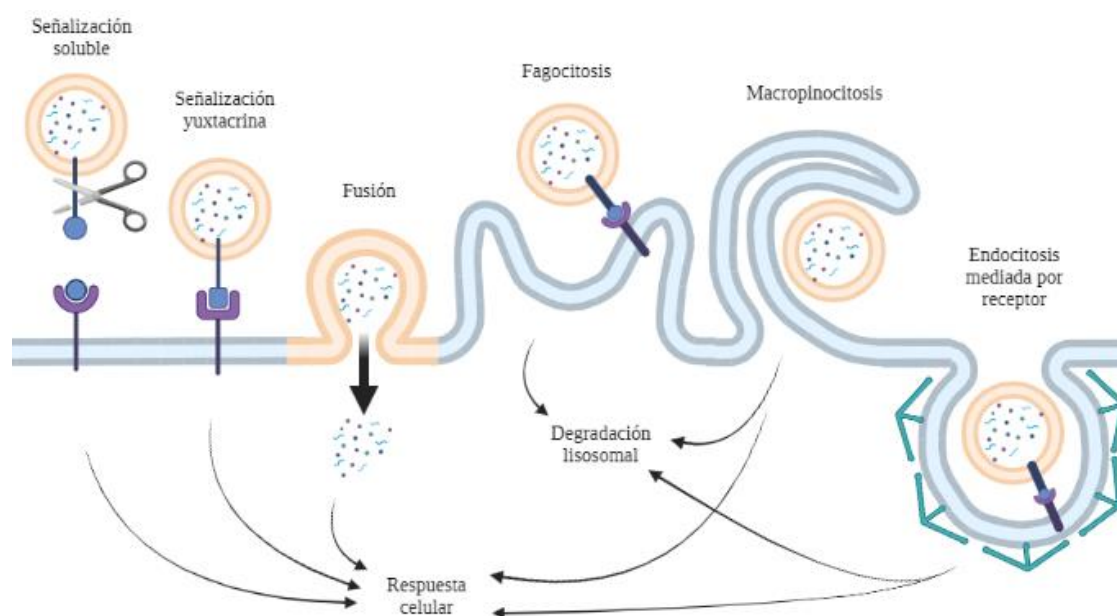


Figura 5. Mecanismos de captación y señalización celular a través de vesículas extracelulares. La proteólisis de un ligando localizado en la superficie de las EVs (señalización soluble) o la yuxtaposición de un ligando localizado en la superficie de las EVs con un receptor de superficie celular (señalización yuxtacrina) puede provocar la transducción de la señal a través de vías de señalización intracelular. La fusión de la membrana de las EVs con la membrana celular permite transferir el contenido al citoplasma de la célula receptora. La interacción de proteínas de superficie de las EVs y receptores celulares permite la endocitosis mediante fagocitosis, macropinocitosis o endocitosis mediada por receptores.

La activación de heterodímeros de integrina conduce a cascadas de señalización intracelular que pueden aumentar la motilidad celular. Las conformaciones de integrina en la membrana celular incluyen cambios que se producen de 'Señalización de dentro hacia fuera' y 'Señalización de fuera hacia dentro'. En la señalización de dentro hacia fuera, proteínas como Kindlin [67] y Talina se unen a la subunidad β de integrina en el citoplasma e

interactúan/desestabilizan un puente salino intracelular, lo que conduce a una conformación extendida con una mayor afinidad de unión al ligando. En la señalización de fuera hacia dentro, la unión de un ligando (moléculas de ECM) se produce extracelularmente resultando en un cambio conformacional a una conformación abierta y extendida (activa) con una alta afinidad de unión al ligando [68]. No se ha encontrado evidencia en la literatura que relacione a TNC con Talina o Kindlin, por lo que es difícil hipotetizar que estas proteínas activen a la integrina directamente a través de un mecanismo de señalización de dentro hacia fuera. Se desconoce si TNC se une a integrina $\alpha v \beta 3$ en su conformación activa, ya que en ese caso la unión del ligando sería dependiente de una señalización de dentro hacia fuera. Por otra parte, la activación de la señalización de fuera hacia dentro por un ligando contenido en las EVs podría explicarse ya que TNC es una proteína secretable [69], por lo que un aumento de sus niveles en la célula receptora causado por la captación de las EVs podría resultar también en un aumento de su secreción.

Este proyecto se enfocó en estudiar el rol de TNC contenida en las EVs con CAV1 y como esta proteína es capaz de aumentar la migración e invasión celular en células de cáncer de mama y la formación de redes vasculares en células endoteliales. En este estudio se postuló que los efectos biológicos de estas EVs dependen, al menos en parte, de su captación mediada por la presencia de integrina $\alpha v \beta 3$ en las células de cáncer de mama.

RESUMEN DE LOS ANTECEDENTES

- La expresión de CAV1, dependiendo del tipo y contexto celular, está asociada a varios procesos importantes en el desarrollo de la metástasis, como la migración e invasión celular.
- CAV1 está presente en las EVs de células humanas de cáncer de mama de alto potencial metastásico.
- Las EVs pueden transferir moléculas bioactivas de una célula a otra, produciendo una reprogramación del comportamiento de las células receptoras.
- La estimulación con EVs derivadas de células metastásicas que tienen CAV1 aumenta la migración e invasión de células de bajo potencial metastásico.

- Existen moléculas de adhesión biológica, como TNC, que cosegregan con CAV1 en EVs de las células de cáncer de mama con alta expresión de CAV1.
- La disminución de los niveles de TNC reduce la motilidad de las células de cáncer de mama.
- TNC aumenta la formación de redes vasculares en células endoteliales.
- Se ha reportado la presencia de TNC en EVs de células de cancer colorectal y de páncreas, sin embargo, no se ha estudiado la funcionalidad de esas EVs.
- Se ha identificado dos sitios de unión a integrina $\alpha\beta3$ en la estructura de TNC.
- La expresión de integrina $\alpha\beta3$ es necesaria para la captación de las EVs en células de cáncer de mama.
- La activación de integrina $\alpha\beta3$ puede ser prevenida utilizando péptidos RGD o anticuerpos bloqueantes.

Estos antecedentes nos permiten formular la hipótesis de trabajo indicada a continuación.

HIPÓTESIS

Las vesículas extracelulares de células de cáncer de mama que contienen CAV1 y TNC aumentan la migración e invasión de las células de cáncer a través de la captación de las vesículas dependiente de integrina $\alpha\beta3$ y promueven la formación de redes vasculares en células endoteliales.

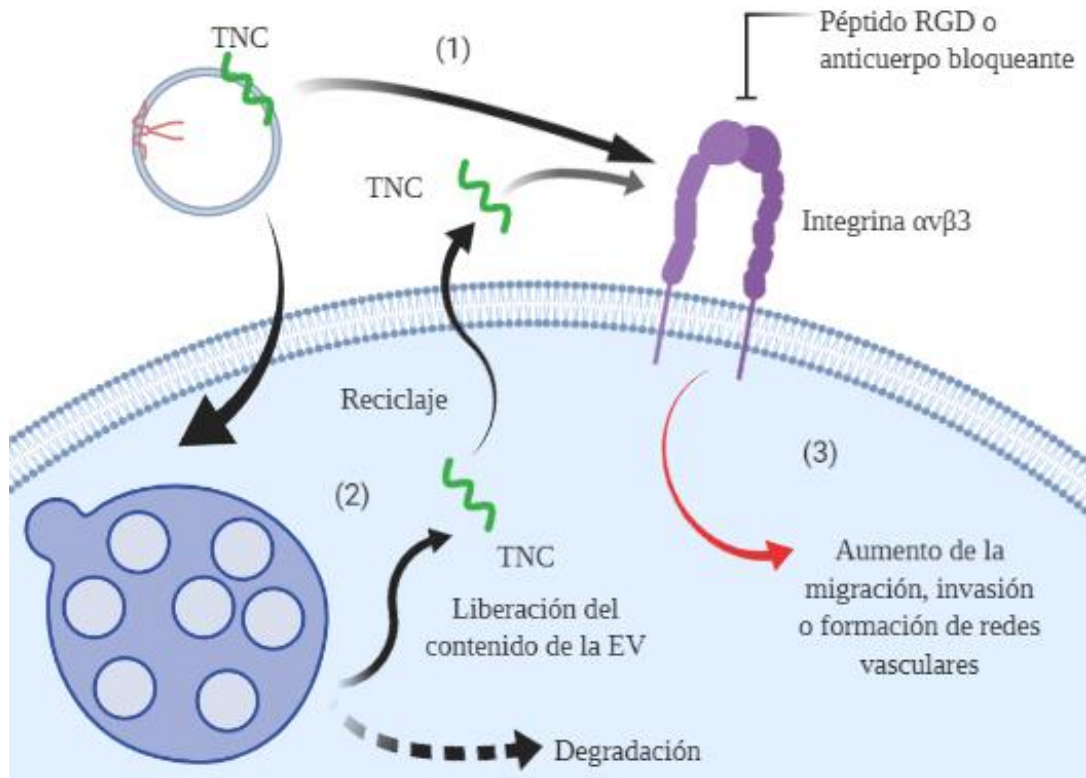


Figura 6. Modelo de trabajo propuesto. (1) La vesícula extracelular con CAV1 y TNC (posicionado en la membrana externa de la EV) activa directamente a integrina $\alpha\beta3$; (2) la EV con CAV1 y TNC es endocitada por la célula receptora, libera su contenido y TNC es reciclada y secretada, pudiendo así activar a integrina $\alpha\beta3$; (3) la activación de integrina $\alpha\beta3$ produce un aumento de la migración e invasión de la célula de cáncer de mama o de la formación de redes vasculares de células endoteliales. El uso de péptidos que contienen el motivo RGD o anticuerpos bloqueantes previenen los efectos mediados por la activación de integrina $\alpha\beta3$.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de Tenascina C contenida en las EVs de células de cáncer de mama con Caveolina-1, sobre la migración e invasión de células de cáncer de mama y la formación de redes vasculares de células endoteliales, evaluar el posible mecanismo por el cual Tenascina C ejerce sus efectos y determinar si un péptido RGD o un anticuerpo bloqueante de integrina $\alpha\beta 3$ previene estos efectos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1 - Determinar el efecto de TNC contenida en las vesículas extracelulares de células de cáncer de mama que expresan CAV1, en la migración, invasión y migración transendotelial de células de cáncer de mama.

1.1 Silenciamiento de TNC en células MDA-MB-231

1.2 Aislamiento y caracterización de EVs

1.3 Evaluación de la migración, invasión y migración transendotelial de células de cáncer de mama pretratadas con EVs con y sin TNC

1.4 Evaluación de la migración e invasión de células de cáncer de mama tratadas con EVs con y sin TNC

2 - Estudiar si la captación de EVs depende de TNC contenida en las EVs y de integrina $\alpha\beta 3$ en las células de cáncer de mama.

2.1 Ensayos de captación de EVs con y sin TNC en células MDA-MB-231

2.2 Efecto de un anticuerpo bloqueante de integrina $\alpha\beta 3$ y de un péptido con el motivo RGD en la captación de EVs en células MDA-MB-231.

3 - Evaluar si TNC contenida en las EVs de células de cáncer de mama induce la migración mediante la activación de integrina $\alpha\beta 3$

3.1 Estudio de la migración dependiente de integrinas en las células MDA-MB-231 estimuladas con EVs con y sin TNC

3.2 Estudio de la localización de TNC y CAV1 en las EVs de células MDA-MB-231

4 - Determinar la contribución de TNC en las EVs de células de cáncer de mama a la formación de redes vasculares *in vitro*.

4.1 Ensayo de formación de redes vasculares en células EA.hy 926 estimuladas con EVs con y sin TNC

2 – METODOLOGÍA

Tabla 1: Lista de reactivos utilizados

NOMBRE	ABREVIACIÓN	DESCRIPCIÓN	FABRICANTE	N° CAT.
Medio Roswell Park Memorial Institute 1640	RPMI	Medio de cultivo	Sigma	23400- 021
Medio Iscove's Dulbecco's Modificado	IMDM	Medio de cultivo	Gibco	HC.SH 30228.0 1
Suero fetal bovino	SFB	Suplemento para medio de cultivo	Biological Industries	040011
Penicilina/ Estreptomina	-	Mezcla de antibióticos	Gibco Life Technologies	15640- 055
Tampón fosfato salino	PBS	Tampón fosfato salino	Gibco Life Technologies	70013
Tripsina/EDTA	TRP	Tripsina porcina	Sigma	T 4049
Ácido Bicinconínico	BCA	Reactivo cromógeno	ThermoFisher Scientific	202233 y 202234
EZ-ECL	-	Kit de detección de quimioluminiscenci a para HRP	Biological Industries	20-500- 1000
West Femto	-	Kit de detección ultrasensible de	ThermoFisher Scientific	34095

		quimioluminiscenci a para HRP		
Exo-spin™	-	Kit de aislamiento de vesículas extracelulares	Cell Guidance Systems	EX01- 50
Tris	-	Tris base	Sigma	T3253
Dodecilsulfato sódico	SDS	Detergente denaturante aniónico	US Biological	151-21- 13
IGEPAL® CA- 630	NP-40	Detergente no denaturante, no iónico	Sigma	I3021
Benzamidina/ Antipaína/ Leupeptina	BAL	Mezcla de inhibidores de proteasas	Sigma, Calbiochem y US Biological	B6506, 178220 y L- 2050
Fluoruro de fenilmetilsulfoni lo	PMSF	Inhibidor de proteasas de serina	Sigma	P7626
Polisorbato 20	TWEEN 20	Detergente no denaturante, no iónico	Sigma	P1379
Ortovanadato de sodio	OVA	Inhibidor de fosfatasas	Sigma	S6508
Fibronectina humana	FN	Glicoproteína de matriz extracelular	Gibco	33016- 015

Cristal Violeta	-	Colorante de triarilmetano	Sigma	C-6158
Metanol	-	Alcohol metílico	Merck	106009
Tritón X-100	TX-100	Detergente no denaturante, no iónico	Merck	108603
Rojo Ponceau	-	Colorante azoderivado rojo	Sigma	P3504
Azul de Coomassie	-	Colorante derivado del trifenilmetano	Fluka	27816
Azul Tripán	-	Colorante azoico	Gibco	152500 61
Matrigel	-	Matriz de membrana basal reducida en factor de crecimiento, sin rojo de fenol	Corning	DLB.35 6231
Glicina	Gly	Componente del buffer de corrida	US Biological	UB.G81 60
Azul dextrano	-	Polisacáridos ramificados de elevado peso molecular	Sigma	D5751
Acilamida/Bisacrilamida 29:1	-	Solución al 40%	Biorad	161- 0146

Persulfato de amonio	APS	Catalizador de la polimerización de la Acrilamida	Sigma	A-3678
Tetrametiletilen diamina	TEMED	Catalizador de la polimerización de la Acrilamida	Merck	110732 0100
Factor de crecimiento vascular endotelial	VEGF	Factor de crecimiento humano	Gibco	PHC 9394
Péptido GRGDNP	RGD	Inhibidor de interacciones integrina-ligando	Santa Cruz	sc- 201176
Anticuerpo anti-integrina $\alpha\beta3$	Ab78289	Anticuerpo bloqueante de la integrina $\alpha\beta3$	Abcam	ab7828 9
Paraformaldehído	PFA	Fijador	Sigma	P6148
Hidróxido de Sodio	KOH	Base fuerte	Fluka	60369
Ácido 1,4-piperazindiestanosulfónico	PIPES	Tampón	Sigma	P1951
Ácido etilenglicol-bis (β -aminoetil	EGTA	Agente quelante	Fluka	3780

éter) -N, N, N', N'-tetraacético				
Azida de Sodio	NaN ₃	Conservante	Sigma	S2002
Cloruro de Magnesio	MgCl ₂	Fuente de iones magnesio	Fluka	63072
Cloruro de Sodio	NaCl	Regulador de la osmolaridad	Winkler	SO- 1415
3-(4,5- dimetiltiazol-2- il)-5-(3- carboximetoxyf enil)-2-(4- sulfofenil)-2H- tetrazolio	MTS	Reactivo de metodo colorimétrico para determinar viabilidad celular	Promega	G5430

A – Cultivo de líneas celulares

La línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26) denominada WT (*wild type*) corresponde a un adenocarcinoma metastásico derivado de líquido pleural. A partir de ésta, se crearon las sublíneas celulares MDA-MB-231(shTNC) que incorporó de manera estable el plasmidio pLVX-IRES-ZsGreen1 que codifica un “*short hairpin*” dirigido contra TNC y MDA-MB-231(shLUC) que incorpora un “*short hairpin*” no relacionado, dirigido contra Luciferasa. Además, el plasmidio pLVX-IRES-ZsGreen1 permite la expresión de la proteína ZsGreen1 para la selección de las células mediante citometría de flujo. Estas líneas celulares se cultivaron en placas de 10 cm² con medio RPMI suplementado con 5% de Suero fetal bovino (SFB) y antibióticos (1%, Penicilina 1000 U/ml y Estreptomicina 10 µg/ml). La línea celular de cáncer de mama humano T-47D (ATCC® HTB-133) corresponde a un carcinoma ductal derivado del líquido pleural. Esta línea celular fue cultivada en placas de 10 cm² con medio RPMI suplementado con 10% de SFB y antibióticos. La línea celular híbrida de la vena umbilical humana EA.hy926 se estableció

fusionando células primarias de la vena umbilical humana con un clon de A549 resistente a tioguanina mediante exposición a polietilenglicol (PEG). Esta línea celular fue cultivada en placas de 10 cm² con medio IMDM suplementado con 10% de SFB y antibióticos. Cuando las líneas celulares alcanzaron una confluencia superior al 70%, se realizó el subcultivo. Se descartó el medio de cultivo y se lavó con PBS estéril, luego se incubó durante 2 min con 0.4 ml de Tripsina/EDTA a 37°C. Una vez que las células se soltaron de la superficie de las placas, fueron recolectadas agregando medio de cultivo con suero (2 – 4 ml). Luego, se centrifugó a 300 x g durante 5 min, el sedimento obtenido se resuspendió en medio de cultivo y se agregó 0.5- 1 ml de esta suspensión a una placa nueva con 8 ml de medio de cultivo. Las líneas celulares se mantuvieron en una incubadora (HERA cell 150) a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂.

B – Transducción lentiviral

Los oligonucleótidos que contienen shARN para Tenascina C (shTNC) (CCAGTGACAACATCGCAATAG) o shARN Control para Luciferasa (shLUC) (TTCTCCGAACGTGTCACG) fueron clonados en el vector de expresión lentiviral pLVX-IRES-ZsGreen1. Se cotransfectó los plásmidos lentivirales shTNC o shLUC con el vector de empaquetado psPAX2 y el vector de envoltura pVSVg en células HEK293T. Después de 48 h, se recolectó el sobrenadante de las células, se centrifugó a 10.000 × g durante 10 min a 4°C y se filtró a través de filtros de acetato de celulosa de 0.45 µm para eliminar los restos celulares. Luego, se transdujeron las células MDA-MB-231 WT con las partículas lentivirales recolectadas y se cultivaron hasta su selección por citometría de flujo. Una vez que las células alcanzaron una confluencia del 100% se desprendieron de la placa de cultivo utilizando tripsina, y luego de 3 min en el incubador a 37°C se inactivó la tripsina con medio de cultivo RPMI con 5% de SFB. Se tomó una alícuota de 20 µl y se añadieron 20 µl de azul tripán; luego se contaron células en una cámara de Neubauer. Después, las células se centrifugaron a 800 x g durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 1 ml de PBS con EDTA 1 mM y 0.5% de SFB (previamente filtrado con un filtro de 0.2 µm). Luego, las células se filtraron utilizando un colador celular para eliminar aquellas células aglomeradas y se transvasó a tubo de citometría estéril. Se llevaron las células para su selección por intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo y se recolectaron en 1 ml de SFB filtrado con filtro de 0.2 µm en tubo de citómetro estéril.

Después se traspasaron células a un tubo de 15 ml, se añadieron 6 ml de medio de cultivo (sin SFB, con Penicilina/Estreptomicina 4%) y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugaron las células a 800 x g durante 10 min, se eliminó el sobrenadante, se resuspendieron en medio de cultivo con 10% SFB y finalmente se sembraron en una placa de cultivo hasta que alcanzaron la confluencia. Este proceso de selección por fluorescencia empleando citometría de flujo se realizó una segunda vez, luego de lo cual se congelaron las células.

También se utilizó las sublíneas celulares MDA-MB-231 con silenciamiento estable de CAV1 (MDA-MB-231 shCAV1) que incorporaron de forma estable un plásmido pLKO.1 que codifica un shARN dirigido contra CAV1 (GCTTCCTGATTGAGATTCAGT), y su control (MDA-MB-231 shC), que tiene shARN dirigido contra Luciferasa (CGCTGAGTACTTCGAAATGTC). La transducción lentiviral se describió previamente [26]. El vector lentiviral pLKO.1 contiene un gen de resistencia a puomicina, por lo que las células se seleccionaron con este antibiótico (2 µg/ml).

C – Preparación de suero fetal bovino libre de EVs

Se preparó SFB sin EVs, distribuyendo alícuotas de 23 ml en 12 tubos de ultracentrífuga (Thinwall Ultra-Clear, Beckman Coulter). Luego, se centrifugó a 100.000 x g durante 18 h a 4°C usando un rotor SW28 en una ultracentrífuga BECKMAN XL-90 [70]. Una vez finalizado este proceso, se recolectó el sobrenadante de cada tubo y se filtró con filtros de 0.2 µm (GE Healthcare). Después, el SFB fue almacenado a -20°C hasta su uso en la preparación de medios de cultivo.

D – Aislamiento de EVs

Para minimizar la copurificación de EVs provenientes del SFB, se utilizó SFB libre de EVs al 5% para la preparación de medio de cultivo RPMI. Los sobrenadantes obtenidos después de cultivar las células durante 48 h fueron centrifugados a 300 x g durante 10 min a 4°C y almacenados a -80°C hasta su uso. Luego, los sobrenadantes se centrifugaron a 16.000 x g durante 30 min a 4°C. Después, el sobrenadante se concentró centrifugando a 3000 x g en ciclos de 10 min utilizando Unidad de Filtro Amicon Ultra-15 (Merck, Millopore). Finalmente, las EV se aislaron usando el kit Exo-spin® siguiendo el protocolo del fabricante (Cell Guidance systems) como se detalla a continuación. El concentrado de sobrenadante se

incubó con Tampón A durante toda la noche en rotación a 4°C. En la mañana siguiente se centrifugó a 16.000 x g durante 1 h a 4°C, luego se descartó la fracción soluble y el sedimento se resuspendió en 0.1 ml de PBS. Después, se removió el tampón de la columna y se centrifugó a 100 x g durante 30 s a 4°C para eliminar el tampón preservante. Luego, se añadió 0,2 ml de PBS y se centrifugó a 100 x g durante 30 s a 4°C para equilibrar la columna. La muestra de sedimento se resuspendió en 0,1 ml de PBS, se agregó a la parte superior de la columna y se centrifugó a 100 x g durante 30 s a 4°C, luego se descartó el eluido. La columna se insertó dentro de un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y se añadió 0,2 ml de PBS en la parte superior de la columna y se centrifugó a 100 x g durante 30 s a 4°C. El eluido contiene las EVs aisladas, las cuales fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

E – Análisis de EVs mediante seguimiento de nanopartículas (NTA)

Se usó el equipo NanoSight NS300 (Malvern) para medir la concentración y la distribución del tamaño de las partículas mediante la evaluación del movimiento browniano en un sistema de dispersión de la luz. Las muestras se diluyeron en PBS (usualmente 1:100) para obtener de 20 a 40 partículas por campo. El nivel de la cámara se configuró para capturar 3 videos de 30 s de duración por cada muestra. Los videos fueron luego analizados para determinar el tamaño promedio de partícula, la moda y distribución de tamaño de partícula; así como la cantidad de partículas (concentración) [38].

F – Microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM)

Las EVs se resuspendieron en PBS frío que contenía 2% de paraformaldehído y se montaron sobre rejillas de cobre, se fijaron mediante la adición de glutaraldehído al 1% en PBS frío durante 5 min, se lavaron en agua destilada estéril, se contrastaron en una solución de acetato de uranilo al 4% a pH 7 durante 5 min y luego se embebieron en metilcelulosa durante 10 min en hielo. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio electrónico de transmisión Philips Tecnai 12 BioTwin (Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile) en funcionamiento a 80 kV.

G – Purificación y cuantificación de proteínas

Para obtener lisados celulares, se puso las placas de cultivo sobre hielo, se eliminó el medio de cultivo y se lavaron dos veces con 0,6 ml de PBS frío con 1 mM de ortovanadato, 10 µg/ml de benzamidina, 2 µg/ml de antipaína, 1 µg/ml de leupeptina y 1 mM de fluouro de fenilmetilsulfonilo (Ova-BAL-PMSF). Luego, se descartó el PBS y se adicionó 0,6 ml de

PBS frío con Ova-BAL-PMSF para arrastrar las células con ayuda de un raspador de células. Después, se agregó el extracto en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y centrifugó a 3000 x g durante 6 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 40 – 50 µl de tampón de extracción (Hepes 20 mM pH 7,4 y SDS 0,1% más Ova-BAL-PMSF) y luego se sonicó cada muestra 2 veces durante 10 s. Después, la muestra se centrifugó a 16000 x g durante 2 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante.

La concentración de proteínas de muestras de EVs aislados y de los lisados celulares se determinó usando el método del ácido bicinonínico (BCA). Las muestras de lisados celulares y de EVs se diluyeron (1:10 y 1:6, respectivamente) en agua nanopura y se agregaron a una placa de 96 pocillos, seguido de la adición de los reactivos en el kit de ensayo de proteínas BCA (ThermoFisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usó un lector de microplacas SPECTROstar Nano para medir la absorbancia a una longitud de onda de 562 nm. La concentración de proteína se determinó usando una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA).

H – Western Blot

Los extractos proteicos se calentaron a 95-100°C durante 5 min, luego se cargaron (30 – 50 µg por carril) en un gel de poliacrilamida/SDS al 10% o al 12% y se separaron realizando la electroforesis durante 90 – 120 min a 100 – 120 V. Luego, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa durante 90 min a 100 V. Al finalizar, se comprobó la transferencia de las proteínas a la membrana utilizando una solución de Rojo Ponceau (0,5 g de Ponceau S y 1 ml de ácido acético glacial aforado a 100 ml con agua destilada). Las membranas se bloquearon en leche descremada al 5% en PBS-Tween-20 al 0,1% durante 1 h y luego se incubaron con el primer anticuerpo (Tabla N° 2) durante toda la noche. Al día siguiente las membranas se lavaron 3 veces durante 10 min con PBS-Tween-20 al 0,1%, se incubaron con el segundo anticuerpo HRP acoplado a peroxidasa durante 1 h a temperatura ambiente y finalmente se lavaron 3 veces durante 10 min con PBS-Tween-20 al 0,1%. La reacción se reveló por quimioluminiscencia (EZ-ECL o West Femto) y la adquisición de imágenes a distintos tiempos se realizó con la cámara digital Hamamatsu (Discovery Gene Xpress).

Tabla 2: Lista de anticuerpos utilizados en Western Blot

Anticuerpo Primario				
Anticuerpo	Dilución	Numero de Catálogo	Marca	Anticuerpo 2°
β-Actina	1:5000	A5316	Sigma	Ratón
Caveolina-1	1:2000	Ab18199	Abcam	Conejo
Calnexina	1:2000	NB100-1965	Novus Biologicals	Conejo
Tenascina C	1:200	200-301-P48	Rockland	Ratón
Alix	1:1000	A2215	Abclonal	Conejo
Integrina β3	1:1000	sc-46655	Santa Cruz	Ratón
TSG101	1:200	sc-7964	Santa Cruz	Ratón
CD81	1:500	sc-166029	Santa Cruz	Ratón
HSP90	1:5000	sc-13119	Santa Cruz	Ratón
Cyr61	1:500	sc-374129	Santa Cruz	Ratón
Anticuerpo Secundario				
Anticuerpo	Dilución	Numero de Catálogo	Marca	
Ratón	1:5000	610-4302	Rockland	
Conejo	1:5000	611-1302	Rockland	

I – Pretratamiento y tratamiento de células T-47D y MDA-MB-231 con EVs

Para los ensayos de pretratamiento se sembraron 2.5×10^5 células MDA-MB-231 WT o 3.5×10^5 células T-47D en placas de cultivo de 6 cm^2 . Después de 24 h se cambió el medio de cultivo por medio con 5% de SFB sin EVs y se trataron las células con $10 \mu\text{g}$ de EVs (equivalente a $5 \mu\text{g}$ de proteínas de EVs/ml) durante 24 h. Para los ensayos de tratamiento *in situ* las células fueron estimuladas durante el tiempo que dura el ensayo de migración o invasión (2 y 24 h, respectivamente, en MDA-MB-231; 5 y 24 h, respectivamente, en T-47D)

con una cantidad proporcional a los 10 µg de proteínas de EVs usadas para tratar 2.5×10^5 células. En los ensayos de migración con tratamiento *in situ* de las EVs, los agentes farmacológicos (péptido RGD y anticuerpos $\alpha\beta3/\beta1/HA$) se añadieron a las células en suspensión 30 min antes de adicionar las EVs.

J – Marcaje fluorescente de EVs

Las muestras de EVs se marcaron con 5×10^{-6} M de PKH67 (Sigma-Aldrich) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La purificación de las EVs marcadas con PKH67 se realizó utilizando columnas del kit Exo-spin®. Las muestras de EVs se descongelaron manteniéndolas en hielo, se añadió un volumen de muestra equivalente a 100 µg de proteínas totales de las muestras de las EVs y se aforó a 0,1 ml con PBS filtrado con filtro de 0,1 µm en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. En otro tubo de microcentrífuga de 1,5 ml se diluyó la tinción PKH67 en el diluyente C en una razón 1:50, se mezcló sin utilizar vortex y se adicionó 20 µl de esta dilución a cada muestra de EVs. La mezcla de EVs con PKH67 se incubó durante 5 min en oscuridad a temperatura ambiente. A continuación, se removió el tapón de la columna del kit Exo-Spin® y se centrifugó a 100 x g durante 15 s a 4°C para eliminar el tampón preservante. Se añadió 0,2 ml de PBS a la parte superior de la columna y se centrifugó a 100 x g durante 15 s a 4°C para equilibrar la columna. Se agregó la muestra de EVs con PKH67 a la parte superior de la columna y se centrifugó a 100 x g durante 15 s a 4°C y se descartó el eluido. Se colocó la columna en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, se añadió 0,2 ml de PBS a la parte superior de la columna y se centrifugó 100 x g durante 30 s a 4°C. El eluido contiene las EVs marcadas, las cuales son almacenadas a -80°C hasta su uso.

K – Ensayo de internalización de EVs

Para el análisis de citometría de flujo, se sembraron 5×10^4 células MDA-MB-231 por pocillo en placas de 24 pocillos. Después de 24 h, las células se pretrataron durante 30 min con el péptido RGD o los anticuerpos y luego se agregaron las EVs marcadas con PKH67 (1000 EVs/célula) durante 3 – 24 h. Una vez completado el tiempo de incubación las células se lavaron con PBS, luego con tampón de lavado ácido (NaCl 0,5 M, ácido acético 0,2 M) para eliminar los EVs unidos a la membrana y una vez más con PBS. Las células se soltaron con tripsina/EDTA a 37°C durante 2 min y se neutralizó la tripsina con medio de cultivo suplementado con SFB. Luego las células se centrifugaron a 300 x g durante 5 min, se

descartó el sobrenadante, se suspendieron en PBS y se analizaron en el citómetro de flujo FACSCanto (BD Biosciences) [71].

L – Ensayo de migración

Los ensayos de migración se realizaron en cámaras de Boyden (Transwell Costar, diámetro de 6,5 mm, tamaño de poro de 8 μ m). Los lados inferiores de los insertos se revistieron con 2 μ g/ml de fibronectina (Gibco). Las células se soltaron de la placa de cultivo con tripsina/EDTA y a continuación se inactivó la tripsina con medio suplementado con SFB. Se tomó una alícuota de la suspensión de células de 20 μ l y se añadieron 20 μ l de azul tripán; luego se contaron células en una cámara de Neubauer. Las células se centrifugaron a 300 x g durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. Las células (1×10^5) se resuspendieron en 0,1 ml de medio de cultivo sin SFB y se agregaron sobre la parte superior de cada inserto. Se adicionó medio de cultivo suplementado con SFB al 10% en la parte inferior de la cámara. Las células se dejaron migrar durante 2 h (MDA-MB-231) o 5 h (T-47D), después de lo cual los insertos se tiñeron durante toda la noche con una solución de Cristal Violeta al 0,1% en etanol al 20%. Al día siguiente, se eliminaron las células que quedaron en lado superior de los insertos con un hisopo de algodón, dejando solamente las células que migraron al lado inferior de los insertos. Finalmente, cuando los insertos se secaron, se contó el número de células en 8 campos diferentes en un microscopio óptico.

M – Ensayo de invasión

En el ensayo de invasión en matrigel se usa una matriz 3D que simula las condiciones de la MEC en la membrana porosa de la cámara. Los insertos se hidrataron durante 2 h en medio libre de SFB. Las células se soltaron de la placa de cultivo con tripsina/EDTA y a continuación se inactivó la tripsina con medio suplementado con SFB. Se tomó una alícuota de la suspensión de células de 20 μ l y se añadieron 20 μ l de azul tripán; luego se contaron células en una cámara de Neubauer. Las células se centrifugaron a 300 x g durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. Las células (2×10^4) se resuspendieron en 0,5 ml de medio sin SFB y se agregaron sobre la parte superior de cada inserto. Se agregó el medio suplementado con SFB al 10% en la parte inferior de la cámara. Después de 24 h, se retiraron los insertos, se lavaron y las células que migraron al lado inferior de los insertos se tiñeron con Azul de Toluidina al 0,1%. Finalmente, cuando los insertos se secaron, se contó el número de células en 8 campos diferentes en un microscopio óptico.

N – Ensayo de migración transendotelial

Se cultivaron las células EA.hy926 ($2,5 \times 10^5$) hasta la confluencia (después de 72 h) en la parte superior de un inserto de cámaras Boyden (Transwell Costar, diámetro de 6,5 mm, tamaño de poro de 8 μm). Se comprobó la impermeabilidad de la monocapa de células EA.hy926 midiendo la absorbancia a 620 nm de muestras de medio de cultivo de la parte inferior de la cámara obtenidas antes y después de incubar la parte superior del inserto durante 30 min con una solución de Azul Dextrano 10 mM. Se marcaron las células MDA-MB-231 WT con CellTracker Green (5 μM ; Life Technologies) durante 30 min. Las células se soltaron de la placa de cultivo con tripsina/EDTA y a continuación se inactivó la tripsina con medio suplementado con SFB. Se tomó una alícuota de la suspensión de células de 20 μl y se añadieron 20 μl de azul tripán; luego se contaron células en una cámara de Neubauer. Las células se centrifugaron a $300 \times g$ durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. Las células (5×10^4) se resuspendieron en 0,1 ml de medio sin SFB y se agregaron sobre la parte superior de cada inserto. Después de 16 h, se detuvo la trans migración al traspasar cámara a pocillo con 0,5 ml de solución de fijación (Paraformaldehído 4%, KOH 0,04 M, PIPES 100 mM, EGTA 2 mM y MgCl_2 2 mM) a temperatura ambiente durante 15 min. A continuación, la cámara se traspasó a un pocillo con 0,5 ml de buffer universal (NaCl 0,15 N, Tris-HCl 0,05 M y NaN_3 0.015 M) y se dejó a temperatura ambiente durante 5 min, luego se almacenó a 4°C protegido de la luz hasta su conteo. Se limpió la parte superior del inserto con hisopos de algodón humedecidos con buffer universal y se contaron las células que migraron marcadas en verde mediante microscopía de epifluorescencia en 8 campos.

Ñ – Determinación de la localización de proteínas en EVs

Para determinar si CAV1 y TNC se localizan en el interior y/o en la superficie de las EVs, 30 – 40 μg de proteínas de las muestras de EVs se incubaron con tripsina/EDTA (1 μg de tripsina por cada 16,6 μg de proteínas de EVs) en ausencia o presencia de TritonX-100 al 0,2% a 37°C durante 5 min [72]. A continuación, las muestras se mezclaron inmediatamente con tampón de carga SDS, se calentaron a $90\text{-}100^\circ\text{C}$ durante 5 min y se analizaron mediante Western blot.

O – Ensayo de formación de redes vasculares

Se privaron de SFB las células EA.hy926 al menos 4 h antes de realizar el experimento. Se agregó 50 μl de matrigel (reducido en factores de crecimiento y sin rojo fenol, Corning®)

esparciendo con la punta de la micropipeta por todo el pocillo en una placa de 48 pocillos cubierta con poli-D-lisina (Corning®). Las células se soltaron de la placa de cultivo con tripsina/EDTA y a continuación se inactivó la tripsina con medio suplementado con SFB. Se tomó una alícuota de la suspensión de células de 20 µl y se añadieron 20 µl de azul tripán; luego se contaron células en una cámara de Neubauer. Las células se centrifugaron a 300 x g durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en medio sin SFB. Se añadieron 3×10^4 células en 0,5 ml a cada pocillo de la placa. Se utilizó el VEGF (Gibco) como control positivo a una concentración de 50 ng/ml. Se dejó la placa en el incubador a 37°C por 16 h, luego de lo cual se obtuvo 5 imágenes por cada condición. Se utilizó el plugin angiogenesis analyzer del programa Image J y se graficó el parámetro número de “master segment” (segmentos, que no están implicados exclusivamente en una rama) [73] normalizado como porcentaje respecto a la condición sin tratamiento.

P – Ensayo de viabilidad celular

Las células MDA-MB-231 WT se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 2×10^4 células por pocillo. Las células se trataron durante 2 y 24 h con el péptido RGD (800 µM) y anticuerpo $\alpha\beta 3$ (2 µg/ml). La viabilidad celular se evaluó adicionando medio de cultivo fresco que contenía 10% de compuesto 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) del ensayo de proliferación celular no radiactiva acuosa CellTiter 96®, según las instrucciones especificadas por el fabricante (Promega). El formazán soluble producido por células viables se detectó mediante la medición de la absorbancia a 490 nm en un lector de microplacas SPECTROstar Nano. Se substrajo los valores de fondo aportados por el exceso de desechos celulares y las burbujas obtenidas midiendo la absorbancia a 650 nm. El vehículo utilizado es PBS y se usó SDS al 5% como control positivo de la disminución de la viabilidad celular.

Q – Análisis proteómico de las EVs mediante Espectrometría de Masas (LC-ESI-MS/MS)

Las EVs se prepararon para proteómica de escopeta o “shot gun proteomics” usando una serie de etapas de reducción, alquilación, digestión de proteínas y desalinización siguiendo el protocolo descrito anteriormente [74]. Para ello, las proteínas se redujeron con ditiotreitól (8,3 mM) y la alquilación se realizó con yodoacetamida (14,3 mM). Las muestras fueron digeridas con tripsina (0,05 µg/µl) una primera vez durante 4 h y una segunda vez durante

toda la noche. La digestión se detuvo acidificando la mezcla de reacción (pH 2 a 3) con ácido trifluoroacético. Los digeridos proteolíticos se desalaron con extracción en fase sólida utilizando un cartucho Oasis HLB (1 cc, 30 μ m; Waters) antes del análisis de espectrometría de masas. Los análisis LC-ESI-MS/MS se realizaron en el modo de iones positivos, se inyectaron las digestiones trípticas (2 μ g de proteína) un espectrómetro de masas Orbitrap Fusion Lumos Tribrid de ultra alta resolución y precisión (Thermo Fisher Scientific) acoplado a un nanoACQUITY UPLC (Waters). Se utilizó un gradiente lineal de ácido fórmico al 0,1% en agua y ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo para la separación. Los espectros de MS/MS se buscaron en la base de datos de humano UniProtKB utilizando el motor de búsqueda Comet MS/MS (versión 2018.01 rev.2) con alquilación de Cys fija y oxidaciones de Met variable. Se permitieron dos sitios de escisión faltantes en péptidos para búsquedas restringidas con tripsina. Los resultados de Comet se validaron utilizando PeptideProphet y ProteinProphet, utilizando una probabilidad ajustada $> 0,90$ para los péptidos y $> 0,95$ para las proteínas. Para la identificación de una proteína, debían detectarse al menos dos péptidos únicos de la proteína de interés. Requerir al menos dos péptidos únicos con una alta puntuación de confianza disminuye marcadamente la tasa de falsos positivos de identificación de proteínas. Cada estado de carga de un péptido se consideró una identificación única. Se utilizó recuentos de péptidos totales para comparar la abundancia de una proteína. Esta metodología se realizó en el Laboratorio del Dr. Jay Heinicke, en la Universidad de Washington, Estados Unidos.

R – Análisis estadístico

Todos los datos se presentan como el promedio \pm desviación estándar (SD) o promedio \pm error estándar de la media (SEM) cuando se especifica en el pie de cada figura, a partir de al menos 3 experimentos independientes. Los datos se comparan en ensayos t-Student's no pareados y se corroboraron con un análisis de Tukey mediante pruebas de comparación múltiple. Se considera que los valores de $P < 0.05$ son estadísticamente significativos. Todos los análisis estadísticos se realizarán utilizando el programa Graphpad Prism, versión 6.0.

3 – RESULTADOS

En trabajos anteriores de nuestro laboratorio se reportó que un grupo de proteínas relacionadas con la adhesión biológica se encontraron exclusivamente en las EVs de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 con CAV1 (MDA-MB-231 WT y shC) y que no se detectaron en las EVs de células sin CAV1 (MDA MB 231 shCAV1). Estas proteínas son Rap-1A, S100A9, CTGF, Cyr61 y TNC. La presencia de Cyr61 y TNC se validó mediante un análisis por Western Blot de las EVs de células MDA-MB-231 WT y shC [38].

En este proyecto de tesis se consideró estudiar también el rol de Cyr61 contenida en las EVs de las células MDA-MB-231, sin embargo, no se logró establecer una sublínea celular con silenciamiento estable de Cyr61, lo que hizo imposible continuar con la siguiente fase del estudio. Estos resultados se muestran en la sección ANEXO.

Objetivo Específico 1: Determinar el efecto de TNC contenida en vesículas extracelulares de células de cáncer de mama que expresan CAV1, en la migración, invasión y migración transendotelial de células de cáncer de mama.

Para proceder con el estudio propuesto en este objetivo es necesario establecer el modelo de estudio. Para ello, se procedió a silenciar la expresión de TNC en la línea celular humana de cáncer de mama MDA-MB-231.

1.1 Silenciamiento de TNC en células MDA-MB-231

La expresión de TNC fue silenciada mediante transducción lentiviral. Se utilizó oligonucleótidos que contienen shARN contra TNC (CCAGTGACAACATCGCAATAG) y shARN Control contra Luciferasa (TTCTCCGAACGTGTCACG), los que fueron clonados en el vector de expresión lentiviral pLVX-IRES-ZsGreen1 que permite la expresión simultánea del shARN y la proteína verde fluorescente ZsGreen1. El vector expresa las dos proteínas de un transcrito de mRNA bicistrónico, lo que permite utilizar ZsGreen1 como indicador de la eficacia de la transducción y como marcador para la selección mediante citometría de flujo.

Las partículas lentivirales se prepararon cotransfectando las células HEK-293T con el vector pLVX-IRES-ZsGreen1 y los plásmidos que codifican la proteína de envoltura VSV-g y el

plásmido de empaquetamiento psPAX2. Después de la transfección (48 h), los medios de cultivo de estas células se usaron para transducir las células MDA-MB-231 y se seleccionaron mediante citometría de flujo. Los histogramas de la Figura 7A muestran el número de células versus intensidad de fluorescencia obtenidos en la selección de las células MDA-MB-231 transducidas con partículas lentivirales (shLUC y shTNC) utilizando citometría de flujo y la tabla de la Figura 7B muestra los porcentajes de células fluorescentes antes y después de la selección.

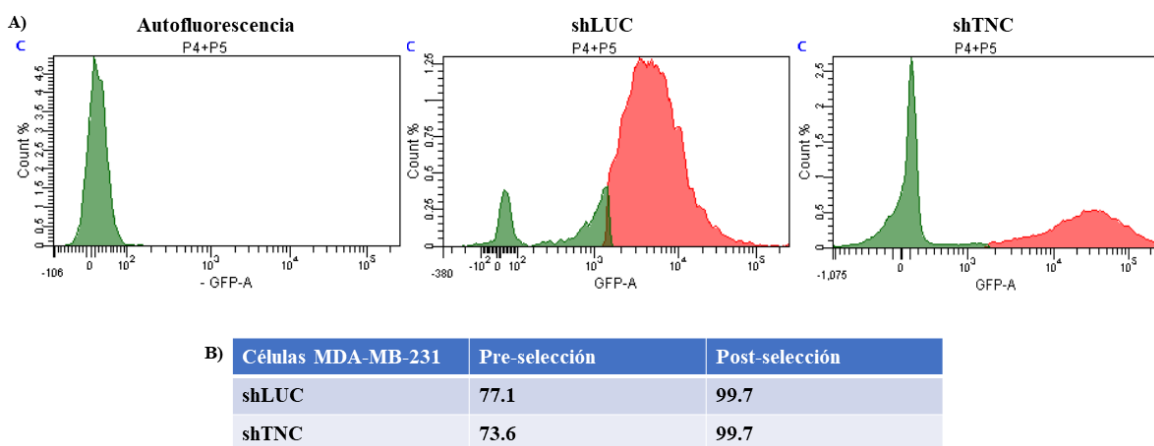


Figura 7. Selección por fluorescencia de las células MDA-MB-231 transducidas de forma estable con shARN contra Luciferasa (shLUC) o contra TNC (shTNC). A) Histogramas de la fluorescencia de células durante la selección utilizando citometría de flujo. B) Cuantificación del porcentaje de células fluorescentes pre y post selección.

La Figura 8A muestra una reducción en el nivel de TNC en células MDA-MB-231 shTNC utilizando western blot. Se observa, además, el nivel de TNC presente en las células WT y en las células transducidas con el shARN control (shLUC). La Figura 8B muestra la cuantificación del nivel de TNC, expresado como porcentaje de la razón TNC/ β -Actina, normalizado respecto al nivel de TNC de las células MDA-MB-231 WT.

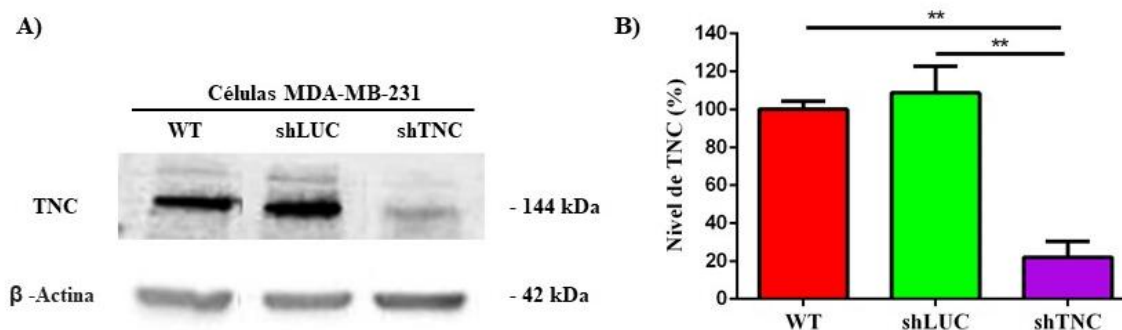


Figura 8. Nivel de TNC en las células MDA-MB-231 transducidas de forma estable con shARN contra Luciferasa (shLUC) y contra TNC (shTNC). A) Western blot de los niveles de TNC después de la selección utilizando citometría de flujo. B) Cuantificación del porcentaje de los niveles relativos de TNC expresado como porcentaje de la razón TNC/ β - Actina (n=3). Los datos se muestran como promedio \pm SEM. **, P < 0.01.

Posteriormente, se comprobó la estabilidad en el silenciamiento de TNC en las células MDA-MB-231 transducidas con partículas lentivirales, utilizando western blot. La Figura 9 muestra que se detectó una reducción estable en el nivel de TNC durante los pasajes 3, 4 y 5 después de la selección utilizando citometría de flujo en células MDA-MB-231 shTNC. Se observa, además, el nivel de TNC presente en células transducidas con el shARN control (shLUC).

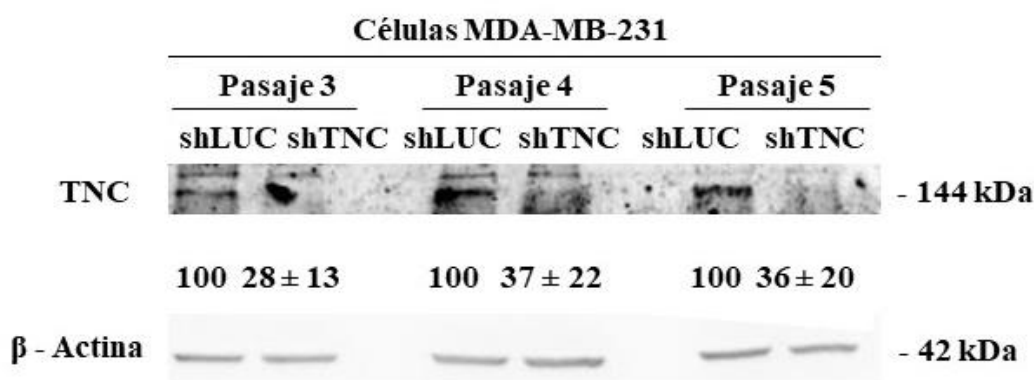


Figura 9. Estabilidad del silenciamiento de TNC en las células MDA-MB-231. Western blot de los niveles de TNC en las células con pasajes 3, 4 y 5 después de la selección utilizando citometría de flujo. Los números bajo el panel superior indican el porcentaje de los niveles relativos de TNC, considerando el nivel de células shLUC como 100% en cada pasaje celular (n=2). Los datos se muestran como promedio \pm SEM.

A continuación, se evaluó la migración de las células MDA-MB-231 WT, MDA-MB-231 shLUC y MDA-MB-231 shTNC. Se observa en la Figura 10A y en las imágenes de la Figura 10B que la migración celular disminuye cuando los niveles de TNC se reducen.

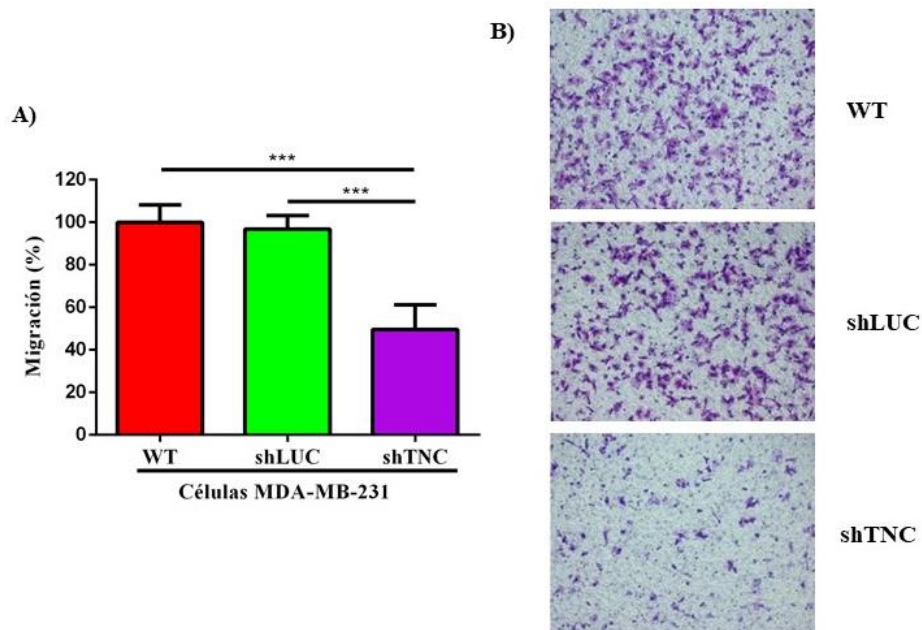


Figura 10. TNC es necesaria para la migración de células de cáncer de mama. Células MDA-MB-231 fueron transducidas de forma estable con un shARN contra Luciferasa (shLUC) o un shARN contra Tenascina C (shTNC) y seleccionadas utilizando citometría de flujo. A) cuantificación (%) de migración y B) Imágenes representativas de los experimentos. El 100% corresponde a un promedio de 140 células/campo (n=3). Los datos se presentan como el promedio \pm SD. ***, $P < 0,001$.

Los resultados mostrados en esta sección muestran que se estableció el modelo celular para el estudio de la función de TNC contenida en las EVs de las células MDA-MB-231. Además, se evidenció la relevancia de esta proteína en la migración de las células de cáncer de mama.

1.2 Aislamiento y caracterización de EVs

A continuación, se aislaron las EVs de las células MDA-MB-231 WT, shLUC y shTNC utilizando el kit Exo-Spin®. La caracterización del tamaño de partícula se realizó utilizando análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA). En la Figura 11A no se aprecian diferencias significativas en la distribución del tamaño de partículas de las 3 muestras de EVs. La Figura 11B muestra las fracciones de vesículas clasificadas en 3 rangos de tamaño (> 200 nm, 150-200 nm y <150 nm), se observa un porcentaje superior al 80% de vesículas con un tamaño inferior a los 200 nm. Finalmente, las Figuras 11C y D muestran el tamaño promedio y la moda de cada muestra de EVs, no observándose diferencias significativas en estos parámetros.

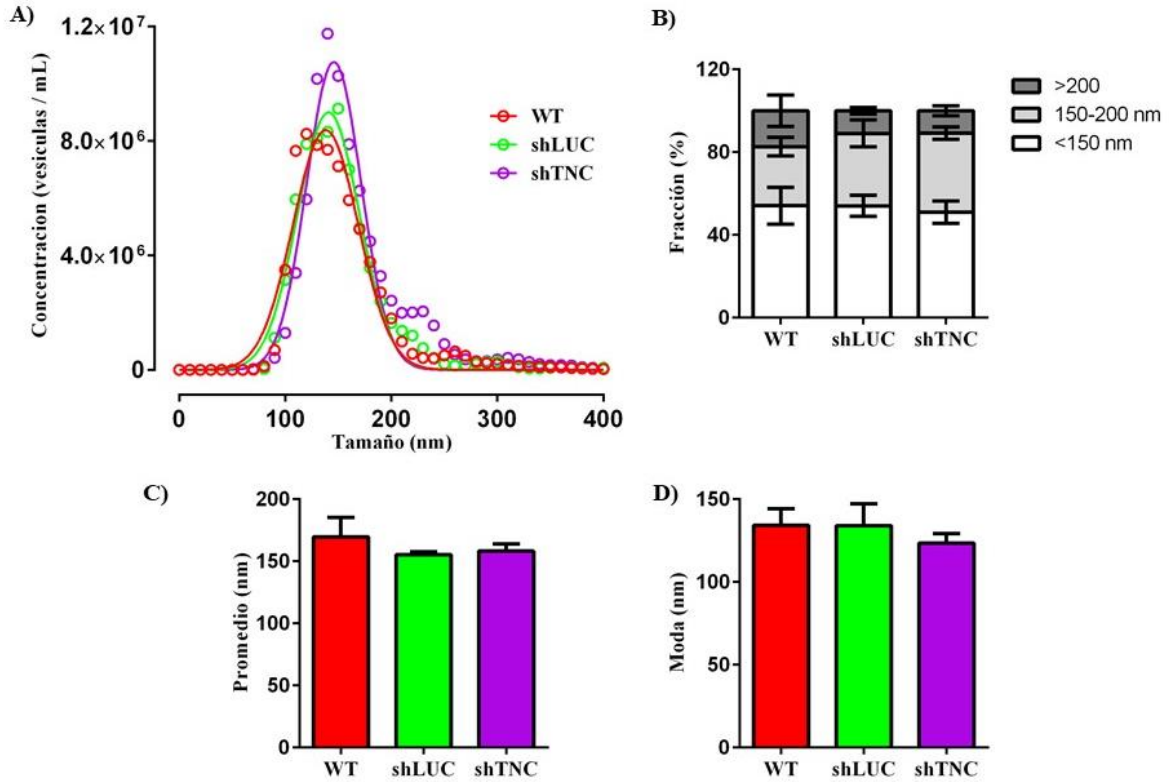


Figura 11. Análisis de seguimiento de nanopartículas de las EVs de células MDA-MB-231. A) La concentración de vesículas versus el tamaño (nm) revela heterogeneidad de tamaño para las EVs de las células MDA-MB-231 WT, shLuciferasa (shLUC) y shTenascina C (shTNC). B) Porcentaje de vesículas que pertenecen a fracciones > 200 nm, 150-200 nm y <150 nm de cada muestra. C) Tamaño promedio de partículas y D) Moda de cada muestra de EVs (n=3). Los datos se presentan como el promedio \pm SD.

La integridad y el tamaño de las EVs aisladas también fue evaluada mediante microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM). La Figura 12 muestra que las EVs tienen una forma esférica, con diámetros entre 80 – 220 nm.

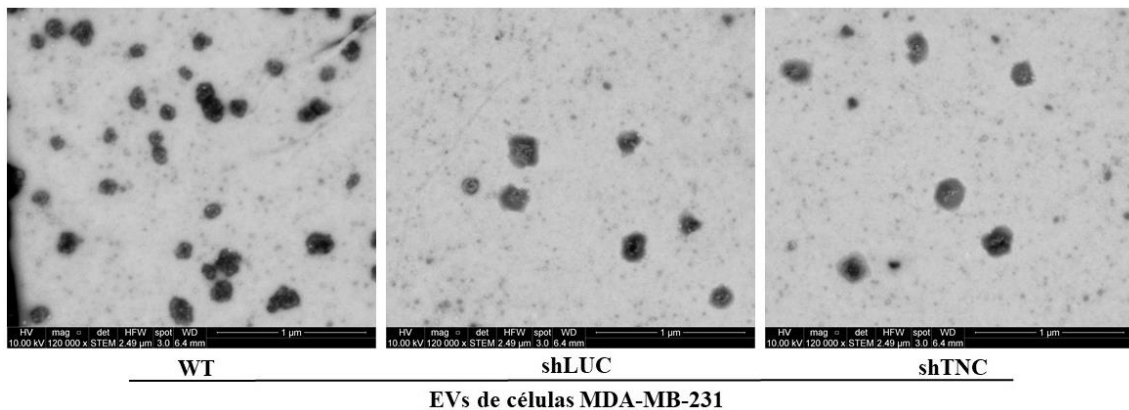


Figura 12. Microscopía electrónica de transmisión y barrido de las EVs de células MDA-MB-231. Se muestra la morfología y tamaño aproximado de las partículas en cada muestra de EVs. Se muestra una barra de aumento de 1 μm en la parte inferior derecha de cada imagen.

Luego, se realizó la caracterización de marcadores proteicos de EVs mediante western blot (Figura 13). El panel de lisado celular (izquierda) muestra un patrón difuso en la detección TNC en las células MDA-MB-231 WT, shLUC y shTNC. No se detectó la presencia de la proteína tetraspanina CD81 (marcador no específico de EVs) en estos lisados celulares. El resto de las proteínas estudiadas: Alix, (marcador de exosomas), Calnexina (marcador de retículo endoplasmático), β -Actina (control de carga) y CAV1 fueron detectadas en todas las muestras analizadas. En el panel de las muestras de EVs (derecha) se detectó niveles abundantes de TNC en las EVs de células MDA-MB-231 WT y shLUC y la detección de bajos niveles en las EVs de células shTNC. Se detectó Alix, CAV1 y CD81 en todas las muestras de EVs, a la vez que no se detectó Calnexina y β -Actina en las muestras de EVs, indicando la pureza y calidad de los EVs aislados.

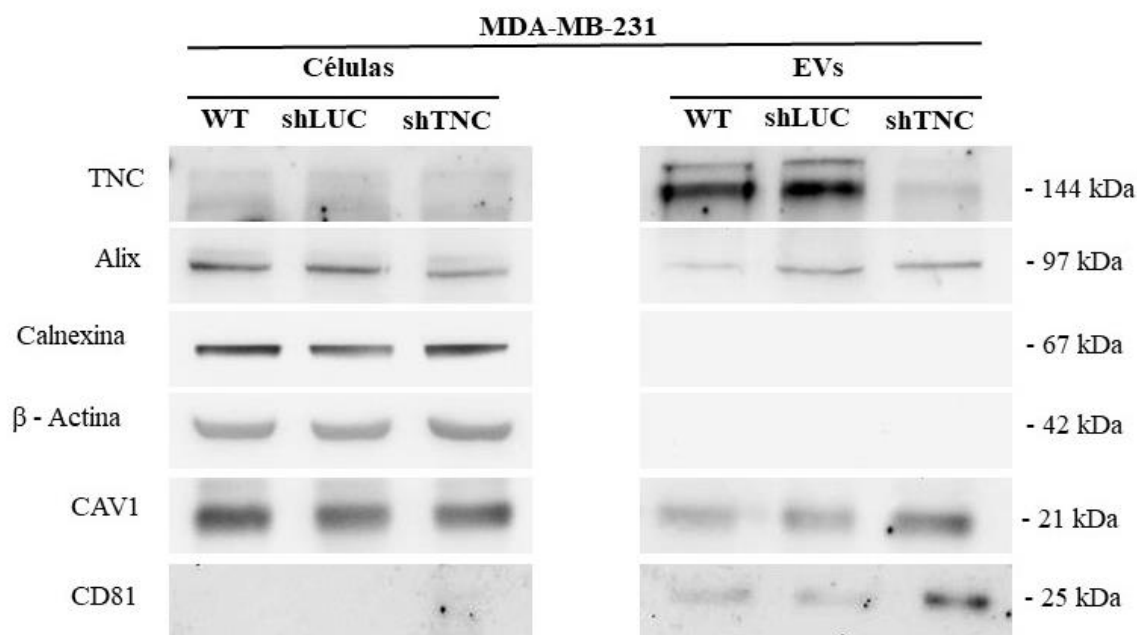


Figura 13. Caracterización de proteínas de las EVs de células MDA-MB-231 mediante western blot. Los extractos proteicos de las líneas celulares MDA-MB-231 WT, shLuciferasa (shLUC) y shTenascina C (shTNC) y sus respectivas muestras de EVs aisladas fueron separadas mediante SDS-PAGE y analizados mediante western blot con los anticuerpos anti-TNC, anti-Alix, anti-Calnexina, anti- β -Actina, anti-CAV1 y anti-CD81 (n= 3).

Los resultados de esta sección demuestran que fue posible aislar las EVs desde el medio de cultivo condicionado por las células MDA-MB-231, y subsecuentemente, caracterizar la distribución de su tamaño de partícula mediante NTA, observar la forma de las EVs mediante STEM e identificar la presencia de marcadores proteicos de exosomas mediante western blot.

1.3 Evaluación de la migración, invasión y migración transendotelial de células de cáncer de mama pretratadas con EVs con y sin TNC

Una vez caracterizadas las EVs se procedió a evaluar el efecto de las EVs que contienen CAV1 pero que no contienen TNC sobre la motilidad de las células de cáncer de mama, usando ensayos de migración, invasión y migración transendotelial (TEM). Las células MDA-MB-231 fueron tratadas durante 24 h con 10 μ g de proteínas de EVs de células MDA-MB-231 WT, shLUC y shTNC cultivadas en medio con SFB sin EVs antes de realizar los experimentos. Las Figuras 14A y B muestran un aumento de la migración e invasión de las células MDA-MB-231 WT que fueron tratadas con las EVs que contienen TNC (WT y shLUC). El tratamiento con EVs que no contienen TNC (shTNC) no modificó la migración e invasión respecto a la condición control de células no tratadas (NT) con EVs. Por otra parte, la Figura 12C muestra que la migración transendotelial de células MDA-MB-231 WT aumentó significativamente respecto al control NT cuando se trataron con EVs de células shLUC, pero no cuando se trataron con EVs de células WT. Finalmente, la migración transendotelial de células MDA-MB-231 disminuyó respecto al control NT cuando se trataron con EVs que no contienen TNC (shTNC).

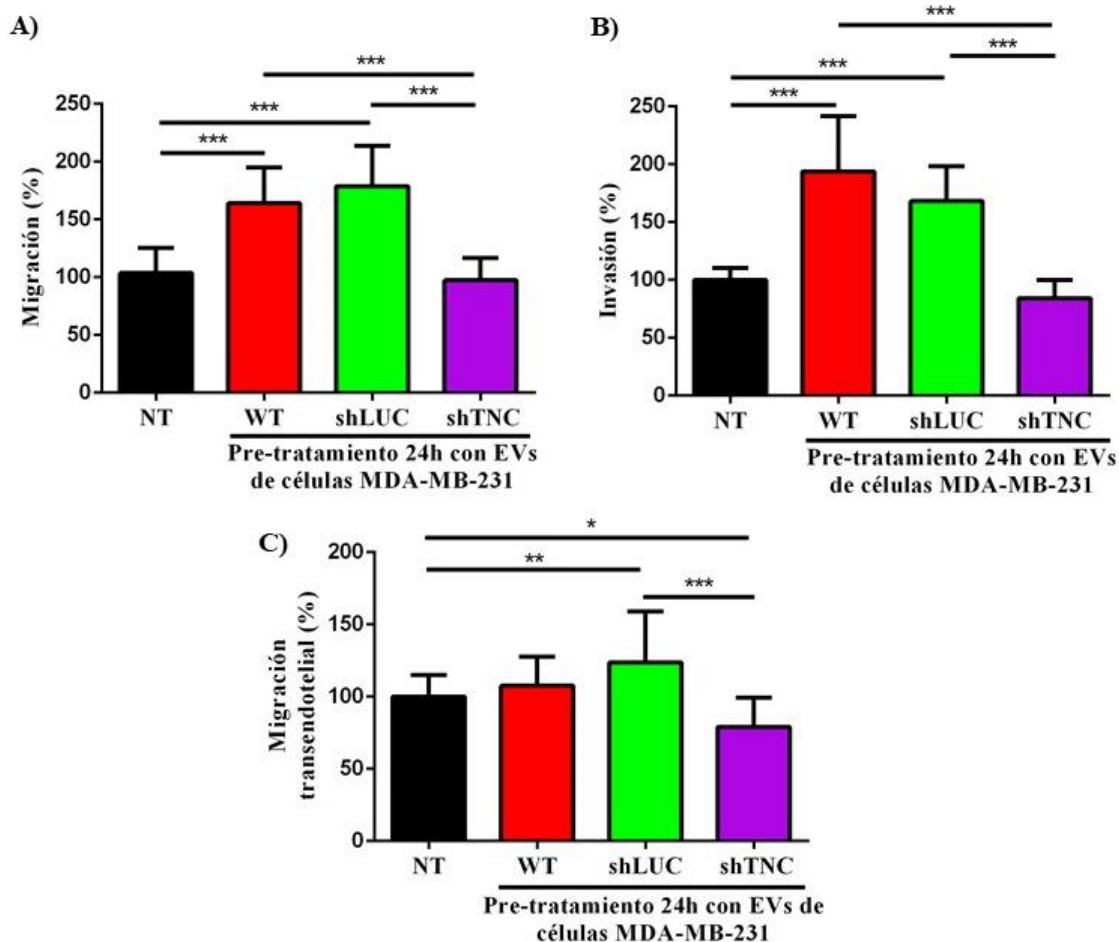


Figura 14. El pretratamiento con EVs de células MDA-MB-231 que tienen TNC aumenta la migración, invasión y migración transendotelial de las células MDA-MB-231. EVs de células MDA-MB-231 WT, shLUC y shTNC (10 μ g de proteínas) fueron utilizados para pretratar durante 24 h a las células MDA-MB-231 WT; posteriormente se realizaron ensayos de A) Migración, B) Invasión y C) TEM con esas células (n = 3). Los datos se presentan como el promedio \pm SD. *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001.

A continuación, se procedió a evaluar el efecto biológico de estas EVs en células T-47D, que corresponden a un modelo de cáncer de mama humano no metastásico y que no expresan CAV1. Las células T-47D fueron tratadas durante 24 h con 10 μ g de proteínas de EVs de células MDA-MB-231 WT, shLUC y shTNC cultivadas en medio con SFB sin EVs antes de realizar los experimentos. Las Figuras 15A y B muestran un aumento de la migración e invasión de las células T-47D que fueron tratadas con las EVs que contienen TNC (WT y shLUC). El tratamiento con EVs que no contienen TNC (shTNC) no modificó la migración e invasión respecto a la condición control de células no tratadas (NT) con EVs.

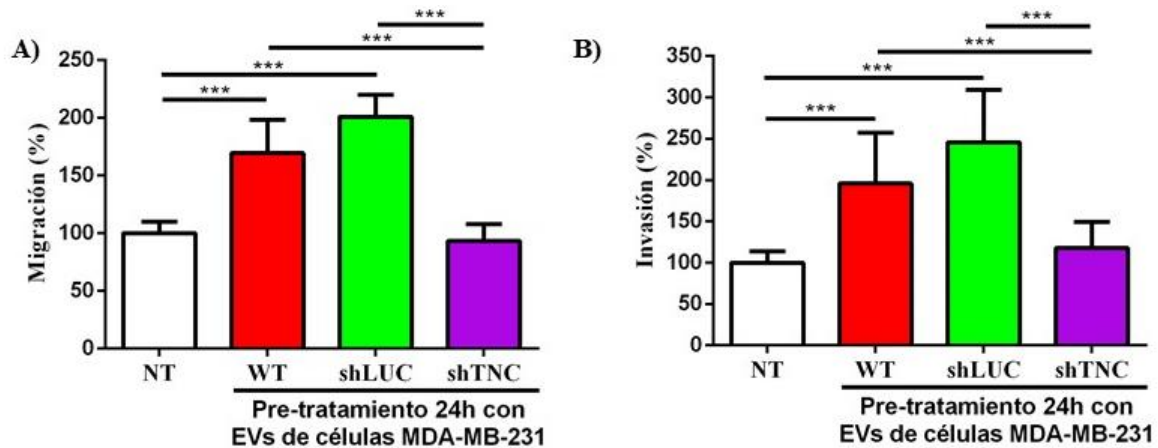


Figura 15. El pretratamiento con EVs de células MDA-MB-231 que tienen TNC aumenta la migración e invasión de las células T-47D. EVs de las células MDA-MB-231 WT, shLUC y shTNC (10 μ g de proteínas) fueron utilizados para pretratar durante 24 h a las células T-47D; posteriormente se realizaron ensayos de A) Migración y B) Invasión con esas células (n = 3). Los datos se presentan como el promedio \pm SD. ***, P < 0,001.

Es importante considerar que se ha reportado que TNC es una proteína que es secretada hacia la ECM en forma de hexámeros [75], sin que se haya estudiado si estos hexámeros forman parte de las EVs o forman un oligómero soluble que no está asociado a estructuras vesiculares. Con el objetivo de demostrar que los efectos de las EVs sobre la migración e invasión no se deben a la actividad de una molécula soluble que permanece inespecíficamente en las muestras de EVs después de su aislamiento [76], se realizaron ensayos de migración e invasión tratando las células MDA-MB-231 WT durante 24 h con el medio de cultivo condicionado por las células MDA-MB-231 (WT, shLUC y shTNC) del que se aislaron las EVs, y que producto de este proceso de purificación ya no contiene EVs. Se observa que el tratamiento con medio de cultivo que no contiene EVs no aumenta la migración o la invasión de las células MDA-MB-231 (Figura 16A y B).

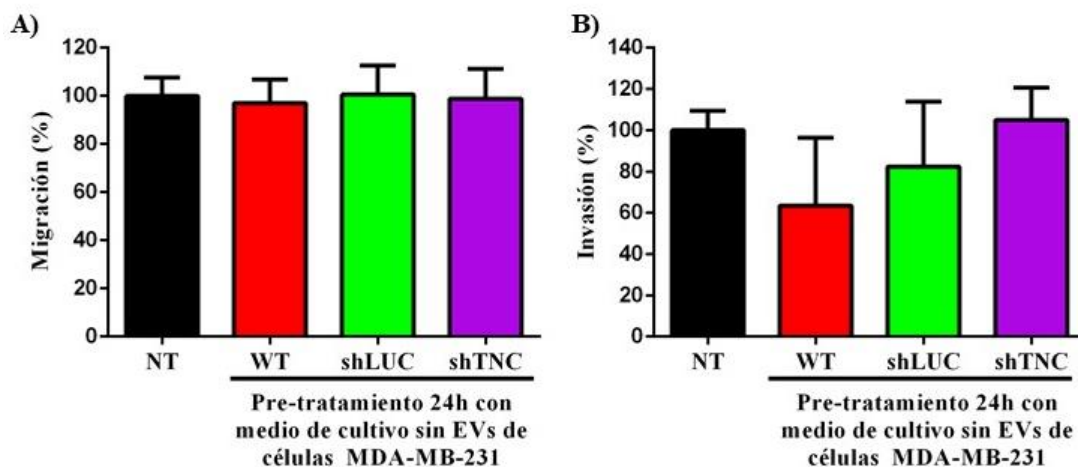


Figura 16. Medio condicionado sin EVs no aumenta la migración e invasión de células MDA-MB-231. El medio condicionado de las células MDA-MB-231 WT, shLUC y shTNC que no contiene EVs se usó para tratar durante 24 h a las células MDA-MB-231 WT; posteriormente se realizaron en ensayos de A) Migración y B) Invasión (n = 3). Los datos se presentan como el promedio \pm SD.

El pretratamiento durante 24 h con EVs de células MDA-MB-231 que tienen TNC (WT y shLUC) aumentó la migración, la invasión y la TEM de las células MDA-MB-231 WT; así como también la migración e invasión de las células T-47D. El tratamiento con medio de cultivo condicionado sin EVs no aumentó la migración e invasión de las células MDA-MB-231 WT.

1.4 Evaluación de la migración e invasión de células de cáncer de mama tratadas con EVs con y sin TNC

Los ensayos previamente mostrados fueron realizados pretratando las células de cáncer de mama con las EVs 24 h antes del desarrollo del experimento. Sin embargo, se desconoce si las EVs tienen un efecto biológico cuando se utilizan *in situ* durante el desarrollo del ensayo que evalúa la migración/invasión celular. Para estudiar esto, las células MDA-MB-231 y T-47D se trataron durante los ensayos de migración con las EVs de las células MDA-MB-231 WT, shLUC y shTNC. Se utilizó una cantidad de proteínas proporcional a los 10 μ g que fueron utilizados para estimular 250.000 células durante las 24 h previas al experimento, como se mostró en los resultados de los experimentos anteriores (Figuras 14 y 15). Los resultados indican que la migración de las células MDA-MB-231 y T-47D aumentó cuando se estimularon con las EVs que contienen TNC (WT y shLUC) y que no se diferencian

respecto al control de células NT cuando se trataron con las EVs que no contienen TNC (shTNC) (Figuras 17A y B).

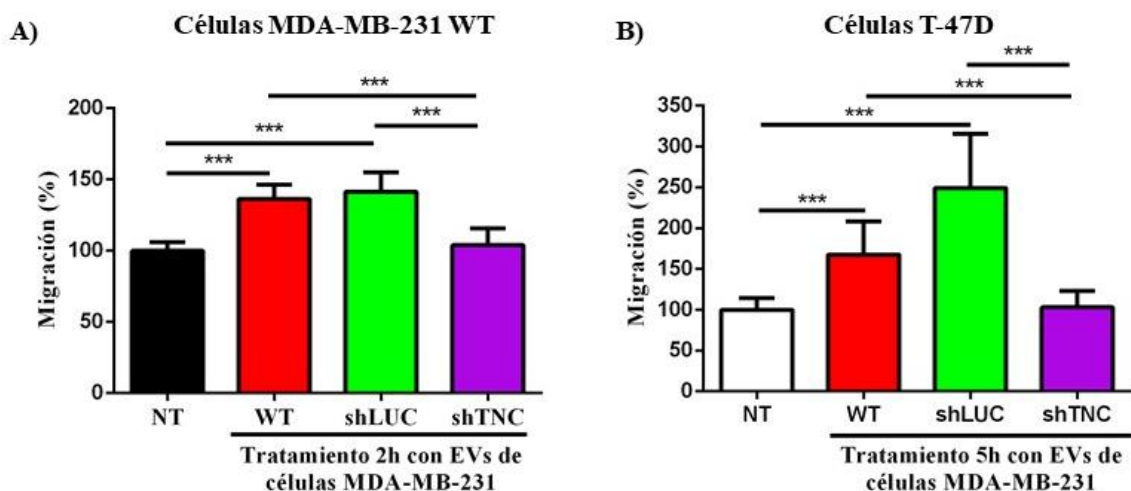


Figura 17. El tratamiento *in situ* con EVs de células MDA-MB-231 que tienen TNC aumenta la migración de las células de cáncer de mama. Las EVs de las células MDA-MB-231 WT, shLUC y shTNC fueron utilizadas para tratar durante los ensayos de migración a las células A) MDA-MB-231 WT y B) T-47D (n = 3). Los datos se presentan como el promedio \pm SD. ***, P < 0.001.

Luego, se repitió el mismo diseño experimental con las EVs de las células MDA-MB-231 WT, shLUC y shTNC, pero durante los ensayos de invasión. Se utilizó una cantidad de proteínas proporcional a los 10 μ g que fueron utilizados para estimular 250.000 células durante las 24 h previas al experimento, como se mostró en los experimentos anteriores (Figuras 14 y 15). Los resultados muestran que el tratamiento no aumentó la invasión de las células MDA-MB-231 WT, respecto a la condición control NT (Figura 18A). En cambio, se observa un aumento en la invasión de las células T-47D que fueron estimuladas con todas las EVs de las células MDA-MB-231 (WT, shLUC y shTNC) (Figura 18B).

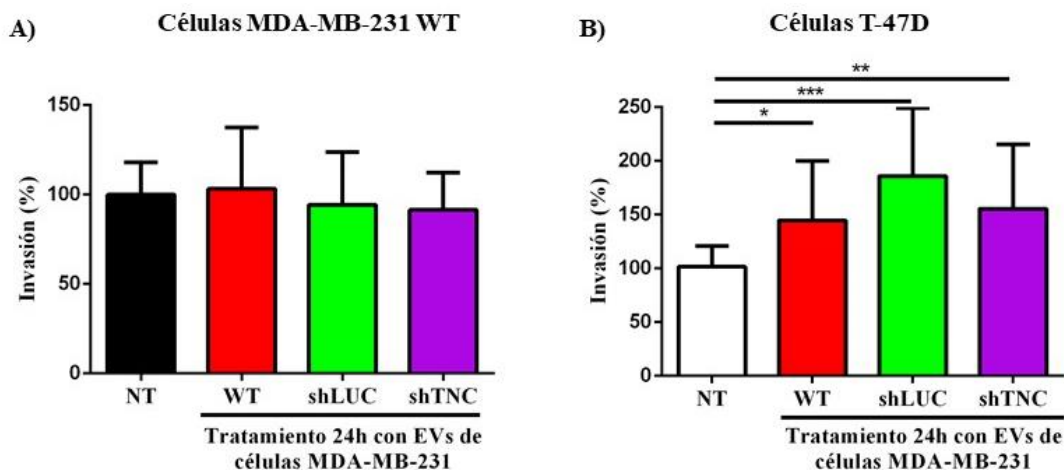


Figura 18. El tratamiento *in situ* con EVs de células MDA-MB-231 tiene diferentes efectos sobre la invasión de las células de cáncer de mama. Las EVs de las células MDA-MB-231 WT, shLUC y shTNC fueron utilizadas para tratar durante los ensayos de invasión las células A) MDA-MB-231 WT y B) T-47D (n = 3). Los datos se presentan como el promedio \pm SD. *, P < 0,05; **, P < 0,01; ***, P < 0,001.

El tratamiento con las EVs que tienen TNC aumentó la migración de las células MDA-MB-231 WT y T-47D. El tratamiento durante 24 h con las EVs no aumentó la invasión de las células MDA-MB-231 WT; sin embargo, sí se observa un incremento en la invasión de las células T-47D de una forma independiente del contenido de TNC de las EVs.

Objetivo Específico 2: Estudiar si la captación de EVs depende de TNC contenida en las EVs y de integrina $\alpha\beta 3$ en las células de cáncer de mama

Existe abundante evidencia en la literatura que muestra que las EVs son captadas por células diana mediante distintos mecanismos. Con el objetivo de relacionar el efecto de las EVs sobre la motilidad celular previamente demostrado, se procedió a evaluar si las EVs son captadas por las células MDA-MB-231 WT. Además de estudiar el efecto de la TNC contenida en las EVs y del uso de inhibidores farmacológicos de integrinas en este proceso.

2.1 Estudio de la captación de EVs con y sin TNC en células MDA-MB-231

PKH67 es una tinción fluorescente que permite marcar la membrana de las EVs. Antes de realizar los ensayos de captación de las EVs en las células MDA-MB-231 se verificó, utilizando NTA, que el marcaje con PKH67 no produjo cambios significativos en la distribución del tamaño de partícula de las EVs (Figura 19).

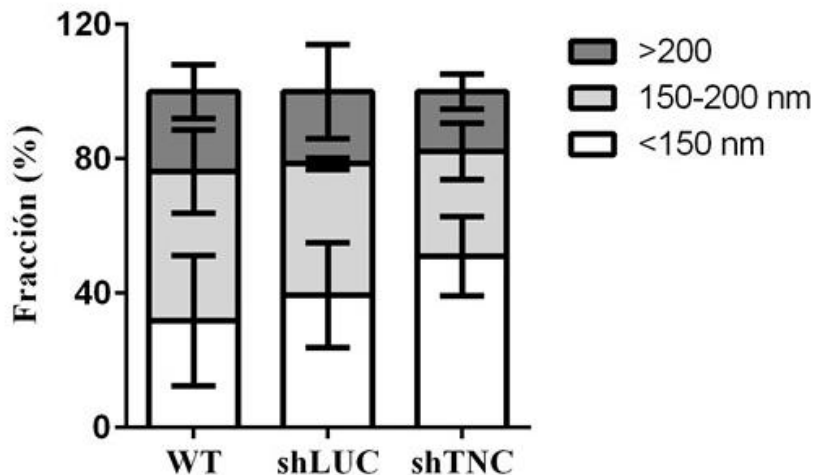


Figura 19. El marcaje con PKH67 de EVs de las células MDA-MB-231 no modifica la distribución del tamaño de partícula. Se muestra el porcentaje de vesículas que pertenecen a fracciones > 200 nm, 150-200 nm y <150 nm de cada muestra de EVs (n=3). Los datos se presentan como el promedio \pm SD.

Las células de cáncer de mama MDA-MB-231 WT fueron tratadas con las EVs de las células MDA-MB-231 WT, shLUC y shTNC marcadas con PKH67 durante 3 y 24 h a 37°C. Se utilizaron 1000 EVs/célula, un control de fluorescencia basal de células sin tratamiento (NT) y un control para determinar la fluorescencia de la marca PKH67 residual del proceso de marcaje y posterior aislamiento de las EVs (condición blanco de PKH67 disuelto en PBS, PKH). La Figura 20A muestra que, a las 3 h, las todas las EVs son captadas en un bajo porcentaje (>5% en MDA-MB-231 WT y shTNC y >10% en MDA-MB-231 shLUC) por las células MDA-MB-231 WT. Por otra parte, en la Figura 20B se observa que las células tratadas durante 24 h captaron las EVs en un porcentaje superior al 85%, sin que la presencia de TNC en las EVs afectara significativamente este proceso.

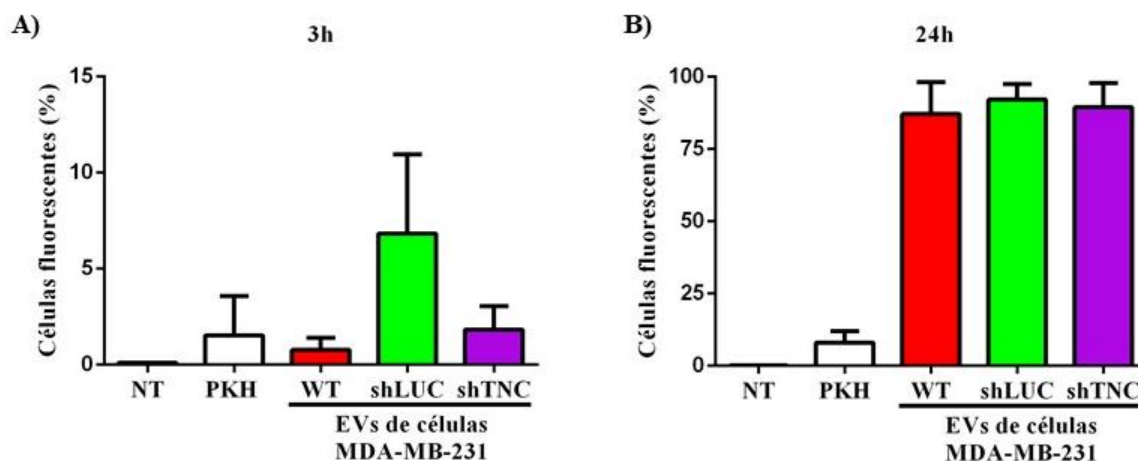


Figura 20. Captación de EVs en células MDA-MB-231. El porcentaje de células MDA-MB-231 WT fluorescentes sin tratamiento (NT), tratadas solo con PKH67 disuelto en PBS (PKH) y producto de la captación de las EVs de células MDA-MB-231 WT, shLUC y shTNC marcadas con PKH67 después de (A) 3 h y (B) 24 h (n = 3). Los datos se presentan como el promedio \pm SD.

Estos resultados muestran que a tiempos cortos de incubación (3 h) la captación de las EVs por las células no es superior al nivel de la condición blanco, que corresponde a la tinción fluorescente no asociada a EVs. En un tiempo de incubación de 24 h la presencia de TNC en las EVs de células de cáncer de mama MDA-MB-231 no modificó su captación.

2.2 Efecto de un anticuerpo bloqueante de integrina $\alpha\beta 3$ y de un péptido con el motivo RGD en la captación de EVs en células MDA-MB-231.

Se ha reportado recientemente que integrina $\alpha\beta 3$ tiene un rol relevante en la captación de EVs en células MDA-MB-231 [57]; sin embargo, en estos estudios no se investigó la posibilidad de bloquear este receptor por medio de agentes farmacológicos. Para explorar esta posibilidad, se utilizó el péptido RGD (GRGDNP) que es un inhibidor no específico de las interacciones integrina-ligando y un anticuerpo bloqueante de integrina $\alpha\beta 3$ (ab78289). Se observa en las Figuras 21A, C y E que, a las 3 h, las EVs de células MDA-MB-231 WT son captadas, en promedio, en un porcentaje no superior al 5%. Este porcentaje de captación de las EVs no resultó ser superior a la condición blanco de PKH67 disuelto en PBS (PKH), por lo que no fue posible comparar el efecto de los pretratamientos utilizados en la captación de las EVs. La Figura 21B muestra que el uso del péptido RGD no reduce la captación de las EVs a las 24 h en ninguna de las concentraciones utilizadas (200, 400 y 800 μ M). Por otra

parte, se observa en la Figura 21D que el uso del anticuerpo bloqueante de integrina $\alpha\beta3$ tiene un efecto dependiente de la concentración y disminuye en un 60% la captación de las EVs a la máxima concentración ensayada (2 $\mu\text{g/ml}$), en comparación al control de células tratadas solo con EVs marcadas con PKH67. Finalmente, la Figura 21F muestra que el uso de un anticuerpo bloqueante contra la subunidad $\beta1$ de integrina (2 $\mu\text{g/ml}$) reduce aproximadamente en un 10% la captación de las EVs, en comparación al control de células tratadas solo con EVs marcadas con PKH67.

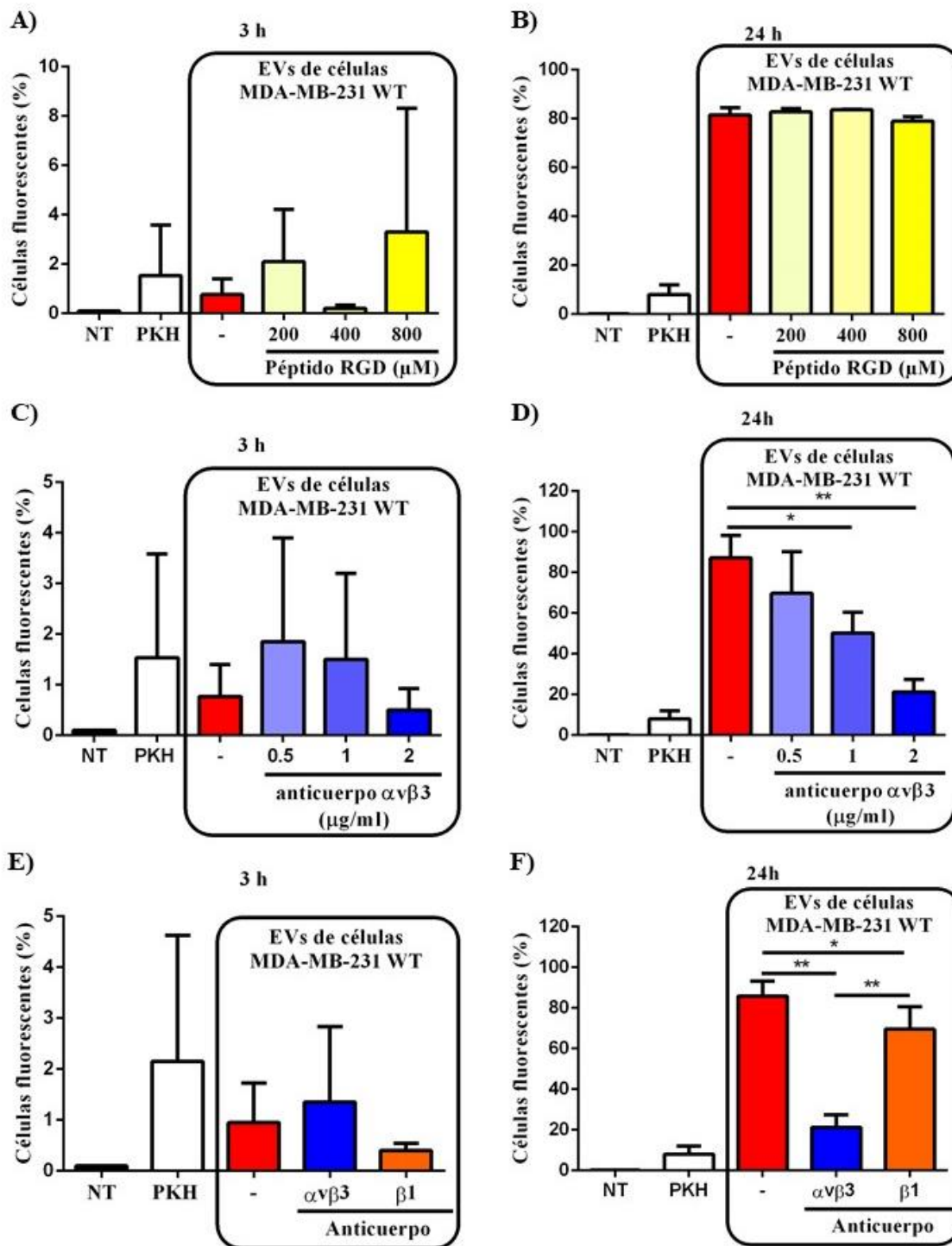


Figura 21. La captación de EVs en células MDA-MB-231 WT depende de integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$. Porcentaje de células MDA-MB-231 WT fluorescentes sin tratamiento (NT), tratadas solo con PKH67 disuelto en PBS (PKH) y tratadas con las EVs de las células MDA-MB-231 WT. Efecto del pretratamiento con el péptido RGD y luego incubación de las células con las EVs durante A) 3 h y B) 24 h; pretratamiento con el anticuerpo bloqueante de integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ y luego incubación de las células con las EVs durante C) 3 h y D) 24 h; y pretratamiento con los anticuerpos bloqueantes de integrinas $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ y β1 (2 $\mu\text{g/ml}$) y luego incubación de las

células con las EVs durante E) 3 h y F) 24 h (n = 3). Los datos se presentan como el promedio \pm SD. *, P < 0.05; **, P < 0,01.

Adicionalmente, se estudio el efecto del anticuerpo contra integrina $\alpha\beta3$ (2 $\mu\text{g/ml}$) y del péptido RGD (800 μM) sobre la viabilidad de las células MDA-MB-231 WT durante 2 y 24 h, mediante el método de MTS. El vehículo utilizado es PBS y se usó SDS como control positivo de la disminución de la viabilidad celular. La Figura 22 muestra que los tratamientos con el anticuerpo o con el péptido RGD no redujeron la viabilidad celular.

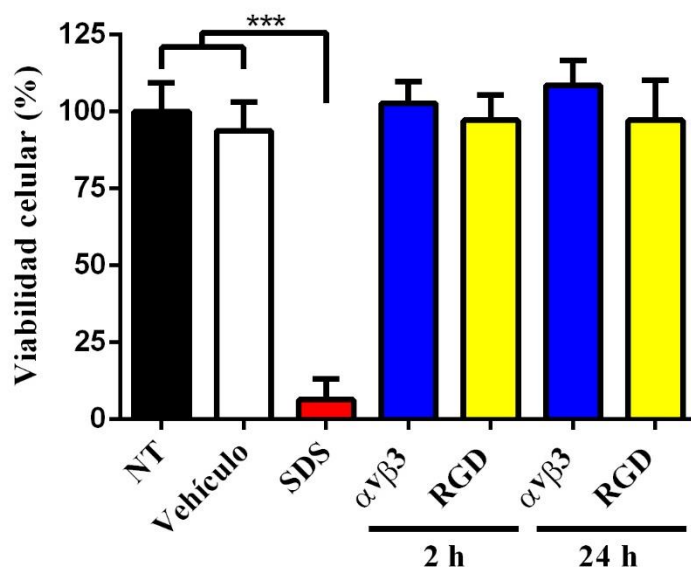


Figura 22. Los inhibidores de integrinas no reducen la viabilidad de las células MDA-MB-231 WT. Las células fueron tratadas con el anticuerpo contra integrina $\alpha\beta3$ (2 $\mu\text{g/ml}$) o con el péptido RGD (800 μM) durante 2 y 24 h, respectivamente (n = 3). Los datos se presentan como el promedio \pm SD. ***, P < 0,001.

El uso de un anticuerpo bloqueante de integrina $\alpha\beta3$ reduce la captación de EVs, de forma dependiente de la concentración utilizada. El uso de un péptido RGD inhibidor inespecífico de las interacciones integrina-ligando no redujo la captación de las EVs. La baja reducción en la captación de las EVs cuando se usó de un anticuerpo contra integrina $\beta1$ sugiere que la captación de las EVs depende específicamente de integrina $\alpha\beta3$.

Objetivo Específico 3: Evaluar si TNC contenida en las EVs de células de cáncer de mama induce la migración mediante la activación de integrina $\alpha\beta3$

Considerando que los ensayos *in vitro* mostraron que el tratamiento con las EVs que contienen TNC aumentó la migración e invasión de las células de cáncer de mama, se procedió a estudiar la posible participación de integrinas, receptores de membrana celular, como un posible blanco involucrado en un mecanismo que explique estas observaciones. Se evaluó además el nivel de expresión de integrina $\beta3$ en las células MDA-MB-231 y T-47D, estos resultados se muestran en la sección ANEXO (Figura Suplementaria 2).

3.1 Estudio de la migración dependiente de integrinas en células MDA-MB-231 estimuladas con EVs con y sin TNC

Debido a que en los ensayos de migración en cámaras Boyden se utiliza fibronectina (FN) humana como sustrato para estimular la migración de las células de cáncer de mama, se comprobó la relevancia de la activación de integrinas en el proceso de migración. Además, se evaluó el efecto de la inhibición de la activación de integrinas empleando agentes farmacológicos. Para ello se utilizó el péptido RGD (GRGDNP) que es un inhibidor no específico de las interacciones integrina-ligando y un anticuerpo bloqueante de integrina $\alpha\beta3$ (ab78289), en presencia de las EVs de las células MDA-MB-231 WT, que contienen TNC.

La Figura 23 muestra que la ausencia de fibronectina (FN (-)) en el ensayo redujo en un 90% la migración de las células MDA-MB-231 WT, respecto de la condición control de migración, en la que sí se usó fibronectina (NT). El uso de un anticuerpo no relacionado, contra Hemaglutinina (HA) (2 $\mu\text{g/ml}$), no modificó la migración respecto a la condición NT. El uso del anticuerpo bloqueante de integrina $\alpha\beta3$ (2 $\mu\text{g/ml}$) disminuyó la migración en un 29% y el uso del péptido RGD (800 μM) la disminuyó en un 76%, respecto a la condición NT. El tratamiento *in situ* con las EVs que contienen TNC aumentó la migración en un 33% en presencia de FN, pero no aumentó la migración en ausencia FN. El uso del anticuerpo HA (2 $\mu\text{g/ml}$) no inhibió el efecto de las EVs que contienen TNC. El uso del anticuerpo bloqueante de integrina $\alpha\beta3$ (2 $\mu\text{g/ml}$) y del péptido RGD (800 μM) previno el aumento de la migración de las células tratadas *in situ* con las EVs que contienen TNC.

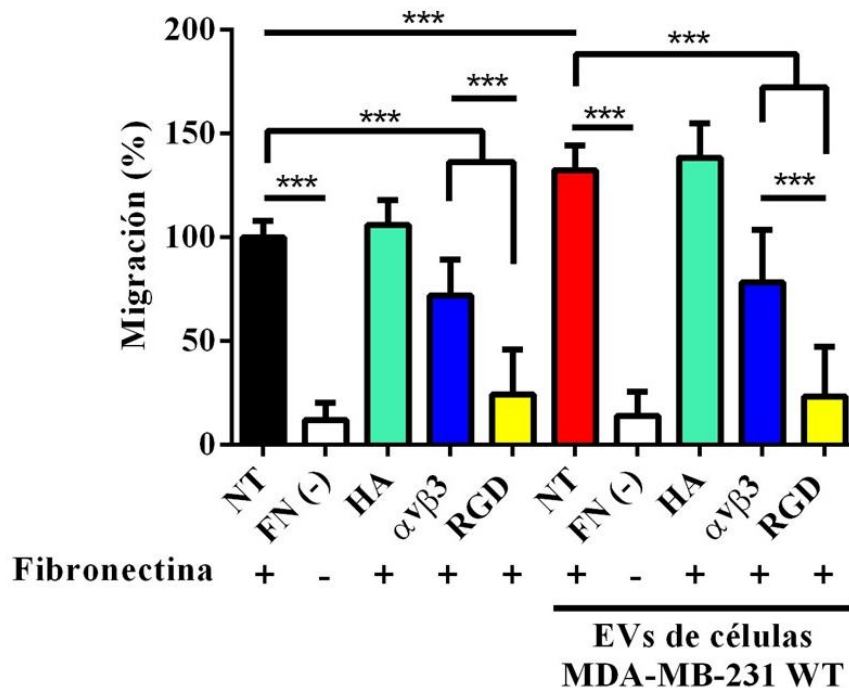


Figura 23. La inhibición farmacológica de integrinas previene el aumento de la migración causado por las EVs con TNC. Se evaluó el efecto de la ausencia de fibronectina como sustrato de la migración de las células MDA-MB-231 WT, así como el efecto del uso de: un anticuerpo contra Hemaglutinina, un anticuerpo bloqueante de integrina $\alpha v \beta 3$ y el péptido RGD. Los mismos agentes farmacológicos fueron usados para pretratar durante 30 min las células que posteriormente fueron tratadas con las EVs de las células MDA-MB-231 WT durante 2 h en los ensayos de migración (n = 3). Los datos se presentan como el promedio \pm SD. ***, P < 0,001.

Estos resultados muestran la relevancia de la acción de fibronectina sobre sus receptores de membrana celular, en los ensayos de migración celular. En ausencia del ligando de integrinas, la migración celular disminuyó considerablemente, sin que el tratamiento con las EVs que contienen TNC revirtiera este efecto. Por otra parte, se demostró que el uso de los inhibidores farmacológicos de la activación de integrinas tiene un efecto dependiente de la especificidad por el receptor. El pretratamiento con el péptido RGD y el anticuerpo bloqueante de integrina $\alpha v \beta 3$ disminuyó la migración basal de las células en presencia de fibronectina y previno el aumento de la migración causado por el tratamiento con las EVs que contienen TNC.

3.2 Estudio de la localización de TNC y CAV1 en las EVs de células MDA-MB-231

Los resultados anteriores no apoyan la hipótesis de que TNC contenida en las EVs de células de cáncer de mama aumente la migración a través de la activación de integrina $\alpha\beta3$. Para que exista la posibilidad de que TNC contenida en las EVs de las células MDA-MB-231 aumente la migración de las células de cáncer de mama a través de la activación de integrina $\alpha\beta3$ debido al tratamiento *in situ*, es necesario que ésta se localice en la superficie de las EVs. Por este motivo, se estudió la topología de TNC y CAV1 contenidas en las EVs de las células MDA-MB-231 WT mediante incubación durante 5 min a 37°C con tripsina de muestras de EVs en ausencia o presencia del detergente TritonX-100 al 0.2% y su posterior análisis mediante western blot. La Figura 24A muestra la tinción de la membrana de nitrocelulosa con rojo ponceau, donde se puede observar una disminución de la intensidad de la tinción en el carril N°4, correspondiente al tratamiento con tripsina y TritonX-100. En el western blot de la Figura 24B se observa que Alix sirvió como control de una proteína localizada en la superficie de las EVs, mientras TSG101 fue el control de una proteína localizada en el interior de las EVs. Por otra parte, CD81 ha sido reportada como una proteína resistente a la proteólisis con tripsina a pesar del tratamiento con detergentes. TNC y CAV1 fueron detectadas en las muestras tratadas solo con tripsina, por lo tanto, se localizan en el interior de las EVs. La Figura 24C muestra la cuantificación de la detección de CAV1 y TNC. En la condición de tratamiento solo con tripsina, la detección de CAV1 y TNC corresponde a 93 y 94 % respecto al control sin tratamiento, respectivamente. El tratamiento solo con TritonX-100 mejora la detección de CAV1. La cuantificación residual de CAV1 y TNC en el tratamiento con tripsina y TritonX-100 fue de 4 y 2%, respectivamente.

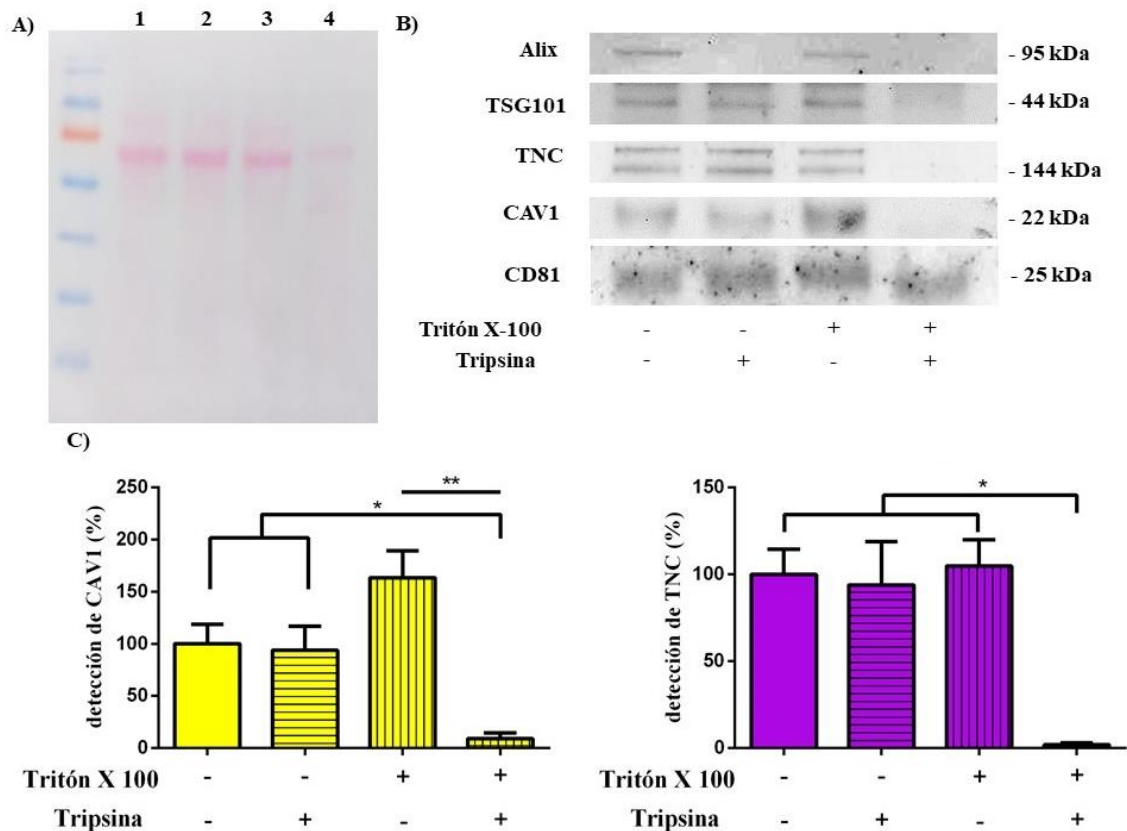


Figura 24. TNC y CAV1 están localizadas en el interior de las EVs de las células MDA-MB-231. Las EVs que contienen TNC (provenientes de células MDA-MB-231 WT) se incubaron con tripsina en ausencia o presencia de TritonX-100 al 0,2% a 37°C durante 5 min. Las muestras fueron separadas por SDS-PAGE y analizadas por Western blot utilizando anticuerpos contra Alix, TSG101, TNC, CAV1 y CD81. A) tinción de la membrana de nitrocelulosa con rojo ponceau, B) western blot representativo y C) cuantificación de la detección de CAV1 y TNC (n=3). Los datos se muestran como promedio \pm SEM. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

A continuación, se estudió el efecto de las EVs de las células MDA-MB-231 WT sobre la migración de las células de cáncer de mama después de una incubación durante 5 min a 37°C con tripsina para evaluar la funcionalidad de las EVs cuando se degradan las proteínas de la superficie de las EVs. Luego, se pretrataron las células añadiendo las EVs, la tripsina y las EVs tratadas con tripsina al medio de cultivo con 5% de SFB depletado de EVs durante 24 h. Posteriormente se realizaron los ensayos de migración. El tratamiento de las EVs con la tripsina impidió que aumentara la migración de las células MDA-MB-231 WT (Figura 25A) y T-47D (Figura 25B).

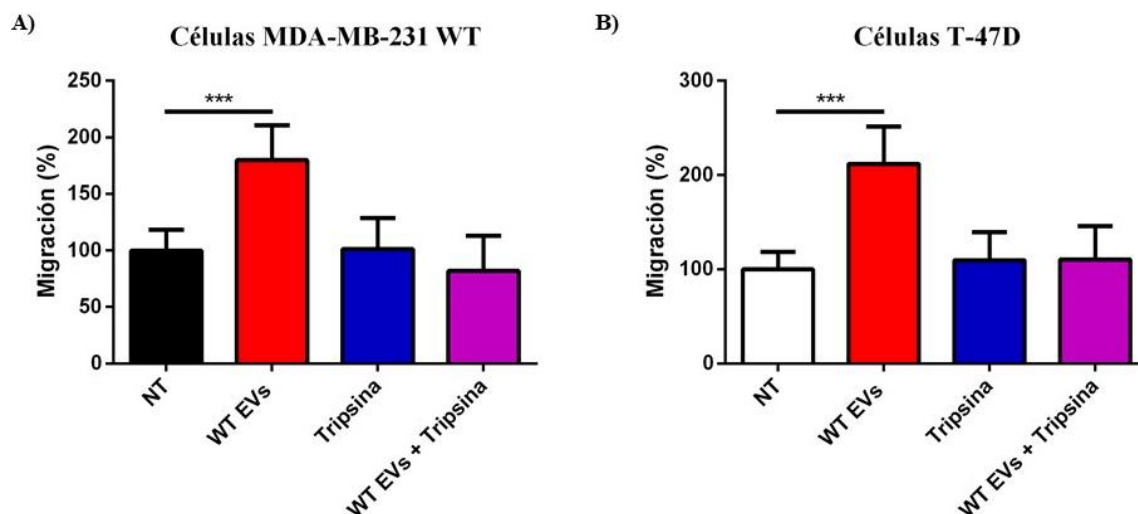


Figura 25. El tratamiento de las EVs con tripsina suprime el aumento de la migración de las células de cáncer de mama. Las proteínas (10 μ g) de EVs de células MDA-MB-231 WT se incubaron con tripsina a 37°C durante 5 min. A continuación, se utilizaron para pretratar durante 24 h a las células A) MDA-MB-231 WT o B) T-47D; posteriormente se realizaron los ensayos de migración con esas células (n = 3). Los datos se presentan como el promedio \pm SD. ***, P < 0,001.

Adicionalmente a los objetivos propuestos en este trabajo de tesis se enviaron muestras de las EVs de las células MDA-MB-231 WT, shC, shCAV1, shLUC y shTNC para análisis por espectrometría de masa de su contenido proteico. Las proteínas detectadas en cada preparación de EVs se muestran en la Tabla Suplementaria 1. Entre estas se encontraron 3 proteínas comunes en las EVs de las células MDA-MB-231 con CAV1 y TNC (WT, shC y shLUC) y 14 proteínas comunes en las EVs de las células MDA-MB-231 con CAV1 y TNC estudiadas en esta investigación (WT y shLUC) (Figura Suplementaria 3A y 3C, respectivamente). En el análisis de estos 2 subconjuntos de proteínas contenidas en las EVs que aumentan la migración de las células de cáncer de mama (EVs de células WT, shC y shLUC / WT y shLUC) se encontró una proteína “accesible en la superficie” de las EVs en el conjunto de EVs WT, shC y shLUC y cinco proteínas en el conjunto de EVs WT y shLUC (Figura Suplementaria 3B y 3D, respectivamente). La proteína del conjunto de EVs de las células WT, shC y shLUC es Transgelina-2 (TAGLN-2) y las cinco proteínas del conjunto de las EVs de las células WT y shLUC son: Subunidad beta de coatómero, Subunidad reguladora 8 de proteasoma 26S, Serina - tARN ligasa citoplasmática, TAGLN-2 y Cadena pesada 1 de la Dineína citoplasmática 1. De estas, la única proteína que se ha reportado tener

alguna relación con integrinas es TAGLN-2. Los resultados de estos análisis se muestran en la sección ANEXO.

Los resultados de este objetivo descartan la posibilidad de que TNC contenida en las EVs de células de cáncer de mama sea capaz de activar la señalización intracelular dependiente de integrina $\alpha\beta3$ como mecanismo de señalización soluble y/o yuxtacrina para explicar el aumento de la migración celular. Además, se evidenció que el tratamiento de las EVs con tripsina suprime el aumento de la migración en las células de cáncer de mama.

Objetivo Específico 4: Determinar la contribución de TNC en las EVs de células de cáncer de mama a la formación de redes vasculares *in vitro*.

La liberación de las EVs por parte de la célula productora hacia el medio extracelular hace posible la comunicación con células diana localizadas en tejidos distantes. Las células de cáncer pueden generar nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes (angiogénesis) para satisfacer sus necesidades de oxígeno y nutrientes. Uno de los mecanismos utilizados por las células de cáncer para dar lugar a la angiogénesis, es la comunicación celular hacia las células endoteliales a través de las EVs. Se ha descrito que el aumento de los niveles de expresión de TNC correlaciona con el aumento de las características pro-angiogénicas *in vitro*. Por este motivo, se estudió si TNC contenida en las EVs de células de cáncer de mama promueve la formación de redes vasculares *in vitro*, como una aproximación experimental al desarrollo de angiogénesis (*in vivo*).

4.1 Ensayo de formación de redes vasculares en células EA.hy926 estimuladas con EVs con y sin TNC

Las células EA.hy926 fueron tratadas con distintas concentraciones de EVs de células MDA-MB-231 WT, shLUC y shTNC durante 16 h. En la Figura 26A se muestran imágenes representativas de las condiciones experimentales: NT, Vehículo, VEGF y 1 μg de EVs de células MDA-MB-231 WT, shLUC y shTNC. La Figura 26B muestra el porcentaje de redes vinculadas, que corresponde al número de segmentos maestros (segmentos, que no están implicados exclusivamente en una rama) normalizado respecto a la condición control no tratada (NT). Se observa que el tratamiento con el vehículo del control positivo (Albúmina

sérica bovina al 3% en PBS) no modifica el porcentaje de redes vinculadas respecto a la condición NT. El control positivo, el tratamiento con 25 ng/ml de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) aumentó el porcentaje de redes vinculadas aproximadamente al doble, respecto a la condición NT. El tratamiento con las EVs que contienen TNC (WT y shLUC) aumentó el porcentaje de redes vinculadas de forma dosis dependiente, sin que el efecto fuese diferente entre el uso de 1 y 10 μ g de EVs en el caso de las EVs de células MDA-MB-231 WT, mientras que solo el tratamiento con 1 μ g de EVs de células MDA-MB-231 shLUC mostró ser diferente respecto a la condición NT. En el caso de las EVs sin TNC, ninguna de las condiciones ensayadas mostró ser distinta a la condición NT; sin embargo, el uso de 10 μ g de estos EVs aumentó el porcentaje de redes vinculadas en comparación al tratamiento con 0,1 μ g.

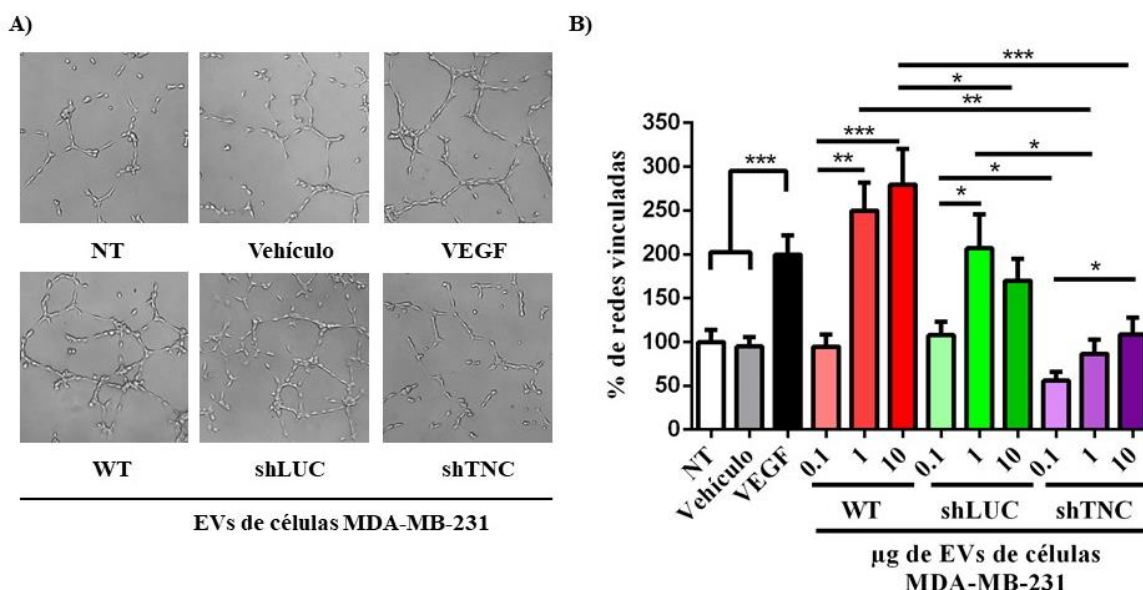


Figura 26. TNC contenida en las EVs de células MDA-MB-231 aumenta la formación de redes vasculares *in vitro* de las células EA.hy926. A) imágenes representativas de las condiciones experimentales y B) gráfico del porcentaje de redes vinculadas (n=3). Los datos se muestran como promedio \pm SEM. *, P < 0,05; **, P < 0,01; ***, P < 0,001.

Los resultados de este objetivo muestran que las EVs que contienen TNC aumentan la formación de redes vasculares en células endoteliales, como un posible mecanismo que explica el rol de esta proteína en el desarrollo y progresión tumoral mediado por la comunicación a través de EVs.

4 – DISCUSIÓN

Las EVs son un mecanismo de comunicación celular, que permite a las células intercambiar proteínas, lípidos y material genético. Sin embargo, la comprensión de qué procesos se desencadenarán por un tipo específico de EVs en las células diana sigue siendo un desafío considerable [29]. La presencia de CAV1 en las EVs y los efectos biológicos que promueven la adquisición de rasgos malignos de las células cancerosas se ha reportado previamente en estudios utilizando las EVs aisladas de células de cáncer hepático [35], de mama [38] y de próstata [77]. En el presente trabajo estudiamos los efectos de TNC contenida en las EVs producidas por las células de cáncer de mama MDA-MB-231, explorando la posibilidad de que la adquisición de rasgos malignos en las células de cáncer que son tratadas con EVs no se debe a la presencia de CAV1 *per se* si no al rol de CAV1 regulando la composición protéica de las EVs y en este caso asegurando la presencia de TNC en las EVs.

Objetivo Específico 1

1.1 Silenciamiento de TNC en células MDA-MB-231

Es muy importante lograr el silenciamiento estable de la proteína de interés, ya que para aislar las EVs es necesario acumular grandes volúmenes de medio de cultivo condicionado (> 100 ml), lo que hace inviable utilizar metodologías de silenciamiento transitorio, debido al alto costo en términos económicos y de tiempo que esto significaría.

Estudios *in vitro* demostraron que la reducción en el nivel de mRNA de TNC correlacionó con una reducción de la migración de células de cáncer de mama humano [47] y la migración e invasión de células de cáncer de páncreas humano y de hámster [48]. Como prueba de concepto, se evaluó la migración de las células MDA-MB-231 WT, shLUC y shTNC (Figura 10). Los resultados corroboran la relevancia de la expresión de TNC en el modelo celular de estudio ya que la migración celular disminuyó cuando los niveles de TNC se redujeron. Estos resultados muestran una gran semejanza al efecto de la reducción de los niveles de CAV1 en el mismo modelo celular. La disminución en el nivel de TNC redujo la migración en un 50%, mientras que la disminución en el nivel de CAV1 redujo la migración en un 60% [26].

1.2 Aislamiento y caracterización de EVs

El término EVs se utiliza para hacer referencia a todas las vesículas que son secretadas por las células. Por otra parte, los estudios sobre las EVs han demostrado que éstas están compuestas por poblaciones muy heterogéneas [29]. Tanto los exosomas como las microvesículas presentan un rango de tamaño superpuesto y una morfología similar; sin embargo, tienen una composición proteica variable, lo que hace imprescindible su caracterización. La distribución del tamaño de partícula de las muestras de EVs de las células MDA-MB-231 WT, shLUC y shTNC reveló la presencia de partículas de tamaño entre 80 – 350 nm de diámetro (Figura 11A). Aproximadamente el 20% de cada muestra de EVs contenía vesículas de un diámetro superior a los 200 nm y aproximadamente un 50% de cada muestra de EVs corresponde a vesículas de más de 150 nm (Figura 11B). Estos resultados reproducen la caracterización de las EVs derivadas de células MDA-MB-231 con y sin CAV1 [38] e indican que las muestras de EVs evaluadas durante este estudio estaban enriquecidas en vesículas de un tamaño típico de los exosomas [29]. Las imágenes obtenidas mediante STEM mostraron una morfología esférica de las EVs, con un diámetro de 80 a 200 nm (Figura 12). Estos resultados indican que se mantuvo la integridad de las vesículas, sugiriendo que el uso del kit Exospin® como método para el aislamiento de las EVs resultó en la obtención de muestras de EV sin daños, una característica que no necesariamente se logra con otros métodos de aislamiento [78].

Algunos de los marcadores de EVs más comunes [79] son proteínas organizadoras de membrana o proteínas que participan en la biogénesis de las EVs, como CD81 y Alix, respectivamente [29]. Se detectó CD81 en todas las EVs, sin embargo, no se detectó en los lisados celulares. Resultados similares se han reportado previamente [80], posiblemente debido al alto enriquecimiento de CD81 en las muestras de EVs, en comparación al lisado celular. Por otra parte, Alix se detectó en los lisados celulares y en las muestras de las EVs (Figura 13). CD81 es miembro de la familia de las tetraspaninas, que son proteínas transmembrana y su presencia sugiere la presencia de una bicapa lipídica, algo específico de las EVs [76]. La presencia de Alix, una proteína citosólica, demuestra que las EVs aisladas contienen material proveniente del medio intracelular [76]. La ausencia del marcador de retículo endoplásmico Calnexina en las EVs está de acuerdo con lo que se ha reportado en la literatura [81] y sugiere que las muestras de EVs obtenidas no contienen restos celulares y/o cuerpos apoptóticos [76]. β -Actina es uno de los componentes del citoesqueleto de las células

eucariotas. Consistentemente con lo informado en trabajos previos, β -Actina no se detectó en las EVs aisladas de las células MDA-MB-231 [38], pero se detectó en los lisados celulares. CAV1 es un componente de las Caveolas, que se consideran un subgrupo dentro de la categoría de las balsas lipídicas [15] que podrían estar directamente implicadas en la generación de ILVs a través de sus efectos sobre las propiedades biofísicas de las membranas [82] y consecuentemente involucrada en la biogénesis de los exosomas. CAV1 se detectó en todas las EVs y en los lisados celulares. A pesar de que la caracterización de las EVs sugiere que aumentó el nivel de CAV1 y CD81 en las EVs de las células MDA-MB-231 shTNC, se debe considerar que la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) no propone marcadores para caracterizar específicamente los subtipos de EVs, dado que existen diferentes fuentes celulares y técnicas de aislamiento [76]. La falta de consenso sobre de un control de carga para normalizar la cuantificación de los western blots de EVs, hace que estos datos se consideren de carácter cualitativo. En este contexto, aunque Alix es un marcador específico de exosomas [29], la técnica de aislamiento de las EVs no es específica para este subtipo de vesículas y por ello no se puede utilizar como control de carga. Por otra parte, CD81 es un marcador no específico de EVs [29], que se detectó aumentado también en las EVs de células con menos TNC. Por estas razones, el aumento en la detección de CAV1 puede interpretarse como un error en la cantidad de EVs que se cargó al realizar el experimento. Se detectaron dos señales de TNC en las EVs de las células MDA-MB-231 WT y shLUC y niveles muy bajos en las EVs de las células MDA-MB-231 shTNC. La detección de TNC en lisados celulares fue menos clara, posiblemente debido a la glicosilación y al proceso de corte y empalme alternativo de la proteína. El número y la organización de las repeticiones de FNIII en la estructura primaria de TNC humana se determina mediante un corte y empalme alternativo, y da como resultado diferentes isoformas. Es posible que las isoformas que difieren en el tamaño de sus cadenas polipeptídicas no se resuelvan como entidades diferentes debido a la heterogeneidad de la glicosilación. Una alta proporción de los posibles sitios de N-glicosilación de TNC están codificados en los dominios FNIII empalmados alternativamente [83]. Se ha informado que los monómeros de TNC humana se presentan en dos tamaños, a menudo denominados isoforma de TNC grande y pequeña [84]. La detección de 2 señales de TNC sugiere la inclusión de ambas isoformas en las EVs de las

células MDA-MB-231. Actualmente, no se dispone de evidencia sobre el estado de glicosilación de TNC contenida en las EVs.

1.3 Evaluación de la migración, invasión y migración transendotelial de células de cáncer de mama pretratadas con EVs con y sin TNC

Estudios previos han demostrado que las EVs de las células MDA-MB-231 son capaces de estimular la migración de las células de cáncer de mama no metastásicas MCF-7. Las proteínas de estas EVs se estudiaron mediante análisis proteómico y su clasificación mostró que muchas de ellas tienen funciones relacionadas con la migración celular. Sin embargo, estos resultados no atribuyeron esta característica a la presencia selectiva de proteínas específicas [36]. Hasta la fecha, solo 2 publicaciones han informado sobre los efectos biológicos de TNC contenida en las EVs. Las EVs con TNC aisladas de MEFs aumentaron la transición epitelio-mesénquima y la invasión de los esferoides de las células de cáncer de mama [40]; mientras que las EVs con TNC aisladas de células de glioblastoma humano indujeron efectos inmunosupresores *in vitro* e *in vivo* [54]. El pretratamiento durante 24 h con las EVs que contienen TNC (WT y shLUC) aumentó la migración e invasión de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 WT y T-47D. Estos resultados guardan gran similitud con experimentos realizados con las EVs con y sin CAV1 sobre las mismas células diana reportados previamente por nuestro laboratorio [38]. La comparación de ambos resultados sugiere que CAV1 podría ser un regulador de la selección de componentes funcionales (como TNC) en las EVs, ya que en los experimentos realizados en esta tesis todas las EVs contenían CAV1 y la carencia de respuesta al tratamiento con las EVs podría atribuirse a la falta de TNC. Adicionalmente, se demostró que los componentes no asociados a las EVs no aumentan la migración ni la invasión de las células MDA-MB-231 WT (Figura 16). Se utilizó medio de cultivo condicionado sin EVs y medio de cultivo fresco (con SFB sin EVs) en una razón 1:1 para incubar las células antes de los ensayos de migración e invasión. Los experimentos se realizaron de esta forma porque se ha reportado que un pH ácido (≤ 6.5) disminuye la viabilidad y migración celular [85]. El color amarillo del medio de cultivo condicionado sin EVs dado por el colorante rojo de fenol indicó que su pH se encontraba en el rango 6,0 – 6,5. TNC es una proteína secretada hacia la ECM en forma de hexámeros [75] y no se ha estudiado si estos hexámeros forman parte de las EVs o forman

un oligómero soluble que no está asociado a estructuras vesiculares. Por lo tanto, si los hexámeros de TNC están presentes de forma soluble (no formando parte de las EVs) en el medio condicionado por las células, ellos no aumentan la migración e invasión de las células MDA-MB-231 probablemente porque no alcanzan la concentración necesaria para lograr el efecto. En este trabajo no se estudió si TNC está presente en forma soluble, para ello se propone concentrar el medio de cultivo sin EVs de las células MDA-MB-231 y determinar si se detecta TNC mediante western blot.

1.4: Evaluación de la migración e invasión de células de cáncer de mama tratadas con EVs con y sin TNC

Los resultados del objetivo previo demostraron un aumento de la migración e invasión a causa del pretratamiento de las células receptoras durante un tiempo de 24 h con las EVs. Sin embargo, estos tiempos de estimulación no correlacionan con el intervalo de tiempo en el que se detecta la activación de la señalización intracelular dependiente de integrinas. El tratamiento con ligandos agonistas de integrinas activa la señalización intracelular durante un tiempo de estimulación que varía desde los 10 min [64], hasta las 2 horas [86]. La activación de la señalización intracelular dependiente de integrinas por tratamiento con exosomas/microvesículas se ha reportado durante un tiempo de estimulación de 1 h [87]. Además, se ha reportado que la estimulación con TNC (como proteína purificada) activa la señalización intracelular dependiente de la activación de integrinas en células de cáncer de mama MCF-7 [88]. Para correlacionar activación de integrina $\alpha\beta3$ con el aumento en la migración e invasión por el tratamiento con las EVs que contienen TNC, se trataron las células MDA-MB-231 WT y T-47D con las EVs durante el tiempo que duran los ensayos. La migración de las células de cáncer de mama aumentó cuando se trataron con las EVs que contienen TNC (WT y shLUC). Recientemente se ha reportado que las EVs aisladas del plasma de pacientes con cáncer de mama en etapa II y III (34% clasificadas como triple negativo) aumentaron la migración, evaluada mediante ensayos de cierre de herida, de las células MDA-MB-231 [89]. Sin embargo, hay que considerar que el tiempo de tratamiento en los experimentos de cierre de herida fue de 48 h, muy superior a las 2 h de los ensayos realizados con cámaras boyden. La invasión de las células MDA-MB-231 no aumentó cuando se estimularon con las EVs, en cambio, la invasión de las células T-47D aumentó por

el estímulo con las EVs de las células MDA-MB-231 WT, shLUC y shTNC (Figura 18B), lo que sugiere que el efecto observado no es dependiente del contenido de TNC de las EVs. Esto podría deberse al efecto de otros componentes asociados a la presencia de CAV1 en las EVs, por ejemplo, Cyr61. Comparativamente, los niveles de mRNA de Cyr61 son mucho mayores en las células MDA-MB-231 que en las células T-47D [90, 91]. Se ha reportado que en las células T-47D, la reducción en el nivel de mRNA de Cyr61 redujo la invasión y que el estímulo con Cyr61 recombinante humana aumentó la invasión [91]. Esta conjetura está supeditada a demostrar que el nivel de Cyr61 no se reduce en las EVs de las células con silenciamiento de TNC. Los resultados previos del laboratorio no evaluaron la migración e invasión de las células MDA-MB-231 estimuladas con EVs con y sin CAV1 en una modalidad *in situ* [38], por lo que no se puede establecer una comparación entre ambos estudios en este aspecto.

Objetivo Específico 2

2.1: Ensayos de captación de EVs con y sin TNC en células MDA-MB-231

El creciente interés en las EVs está relacionado con su capacidad para desencadenar cambios fenotípicos en las células receptoras mediante su captación y la posterior entrega del contenido de las EVs. Las diferencias en el tamaño de las EVs y/o los componentes de la superficie probablemente influyen en su reconocimiento y captación por las células blanco; sin embargo, los mecanismos de captación de EVs y la entrega de carga al citosol de las células receptoras aún no están completamente caracterizados [92]. Aunque la mayoría de los estudios informan sobre la internalización de las EVs por las células receptoras, no está claro si esto ocurre a través de un proceso no específico como la macro o micropinocitosis, o a través de una vía específica dependiente de receptores [93]. Se ha propuesto que muchas proteínas localizadas en la superficie de las EVs y en las células receptoras, incluidas las integrinas [94], están involucradas en la captación de EVs. Se han identificado dos sitios de unión a integrina $\alpha\beta3$ en TNC que contienen la secuencia RGD dentro de la repetición 3 del dominio FNIII y en el dominio FBG C-terminal [55]. Además, se ha reportado que integrina $\alpha\beta3$ tiene un rol relevante en la captación de EVs en las células MDA-MB-231 [57], ya que se demostró que la reducción de sus niveles de expresión disminuye la captación de las EVs. A causa de estas observaciones se planteó que TNC contenida en las EVs podría tener un rol

regulador de la captación de las EVs en las células receptoras mediante su interacción con integrina $\alpha\beta3$. Es necesario aclarar que esta hipótesis está condicionada a demostrar que la TNC contenida en las EVs está localizada en la superficie (y no en el lumen) de las EVs. La captación de las EVs después de 24 h fue de aproximadamente un 80% en todas las muestras (Figura 20B), sin evidenciar diferencias en la captación de las EVs que contienen (WT y shLUC) o no TNC (shTNC). Este resultado sugiere que el efecto sobre la migración de las células de cáncer de mama tras una incubación de 24 h con las EVs no depende de su captación por las células, sino de la presencia de TNC en las EVs. Por otra parte, la captación de EVs en un tiempo de incubación de 3 h fue muy baja, lo que sugiere que el mecanismo por el que las EVs con TNC aumentan la migración de células de cáncer de mama mediante un estímulo *in situ* no requiere de su captación por parte de la célula diana. Dentro de las limitaciones de técnicas de este estudio, es importante considerar que PKH67 es una molécula compuesta por una carbocianina lipofílica como andamio fluorescente y colas alifáticas que le permiten intercalarse con las bicapas lipídicas de la membrana de las EVs [95]. Por lo tanto, la detección de la señal fluorescente en las células receptoras no implica necesariamente que exista una entrega del contenido de las EVs en el citosol.

2.2: Efecto de un anticuerpo bloqueante de integrina $\alpha\beta3$ y de un péptido con el motivo RGD en la captación de EVs en células MDA-MB-231

Si bien se ha reportado que integrina $\alpha\beta3$ tiene un rol relevante en la captación de EVs en células MDA-MB-231 [57], en esa investigación no se estudiaron los efectos del bloqueo farmacológico del receptor. Para explorar esta posibilidad, se utilizó un péptido RGD que es un inhibidor no específico de las interacciones integrina-ligando y un anticuerpo bloqueante de integrina $\alpha\beta3$. Se reportó previamente que en el rango de concentraciones de 200 - 800 μM , el péptido RGD reduce la señalización intracelular dependiente de la activación de integrina $\alpha\beta3$ en células de colon [63] y próstata [64]. Por otra parte, la secuencia de aminoácidos utilizada para generar el anticuerpo bloqueante de integrina $\alpha\beta3$ está patentada. Sin embargo, la información disponible, entregada por el fabricante, indica que se generó mediante un hibridoma a partir de células B aisladas de un ratón inmunizado con integrina $\alpha\beta3$ humana. El anticuerpo monoclonal producido a partir del hibridoma reconoce un epítipo conformacional de integrina $\alpha\beta3$ [96]. El uso de este anticuerpo bloqueante de

integrina $\alpha\beta3$ ($2 \mu\text{g}/\text{pocillo}$) previno el aumento de la migración celular inducida por el tratamiento con OPN, un ligando agonista de integrinas, en células mesenquimales estromales humanas [62]. A las 24 h de incubación con las EVs, el uso del péptido RGD no redujo la captación de las EVs en ninguna de las concentraciones utilizadas (Figura 21B). Por otra parte, el anticuerpo bloqueante de integrina $\alpha\beta3$ disminuyó en un 60% la captación de las EVs a la máxima concentración ensayada ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$). La menor respuesta del anticuerpo bloqueante de la subunidad $\beta1$ de integrina [97] sugiere que el efecto inhibitor de la captación de las EVs depende específicamente de integrina $\alpha\beta3$, ya que se ha informado la presencia de heterodímeros de integrina $\alpha\beta1$ [98] y $\alpha5\beta1$ [99] en las células MDA-MB-231, todos los cuales son RGD-dependientes [100]. Se ha sugerido que la captación de EVs en las células MDA-MB-231 se inicia con la interacción entre EVs y HSPGs, seguido del reclutamiento de integrina $\alpha\beta3$, activación de la quinasa de adhesión focal y finalmente endocitosis mediada por dinamina del complejo EVs-HSPGs- $\alpha\beta3$ [57]. Es importante destacar que en esta secuencia de eventos se propone que la activación de integrina $\alpha\beta3$ no necesariamente es mediada por la unión de un ligando localizado en la superficie de las EVs. No obstante, se ha demostrado que integrina $\alpha\beta3$ y sindecan-1, un miembro de la familia de HSPGs, están acoplados funcionalmente. Integrina $\alpha\beta3$ depende de la secuencia de aminoácidos 88-121 del ectodominio de sindecan-1 para activarse y mediar la propagación y migración de células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 y MDA-MB-435 sobre vitronectina, un ligando de integrina $\alpha\beta3$ [58]. No se ha determinado cuál es el sitio de interacción de las subunidades de integrina con el ectodominio de sindecan-1. Sin embargo, el motivo RGD se une en una interfaz entre las subunidades α y β de integrina [101], por lo que se podría hipotetizar que la falta de efecto del péptido RGD se debe a que este no inhibe la interacción de sindecan-1 con integrina $\alpha\beta3$. Estos resultados confirman la relevancia de integrina $\alpha\beta3$ en la captación de las EVs y sugieren que se requiere de la disponibilidad de otros sitios de unión del receptor, distintos del sitio de unión al motivo RGD, para interactuar con las EVs y/o HSPGs. Una posible explicación para este resultado radica en la diferencia de tamaño que existe entre ambas moléculas. Un anticuerpo mide aproximadamente 10 nm [102], mientras que el tamaño del hexapéptido GRGDNP se puede estimar en 0.25 nm [103]. Por lo que, el uso de una molécula más grande como el anticuerpo generaría un mayor impedimento para la interacción entre integrina y las EVs/HSPGs.

Objetivo Específico 3

3.1: Estudio de la migración dependiente de integrinas en células MDA-MB-231 estimuladas con EVs con y sin TNC

Tanto TNC como Fibronectina (FN) son ligandos comunes de los heterodímeros de integrinas $\alpha\beta3$ y $\alpha8\beta1$ [100]. Ensayos de migración, en los que la superficie inferior de la membrana de los insertos Transwell se recubrió con BSA, tenascina o FN, mostraron que la migración de las células de glioblastoma humano disminuyó en un 90% cuando se usó BSA y aumentó en un 50% cuando se usó tenascina, en comparación al uso de FN [104]. Estos resultados ponen en evidencia la relevancia del uso de ligandos de integrinas en los ensayos de migración celular mediante el uso de los insertos Transwell. En este contexto, se ha reportado que FN es ligando de integrinas con motivo de unión RGD ($\alpha11b\beta3$, $\alpha\beta3$, $\alpha5\beta1$, $\alpha\beta6$, $\alpha8\beta1$ y $\alpha\beta1$) y LDV ($\alpha4\beta1$ y $\alpha4\beta7$) [100], por lo que el aumento en la migración celular observado en la Figura 17, en los que se utilizó FN para recubrir la superficie inferior de la membrana de los insertos Transwell, no necesariamente puede atribuirse a la activación de integrinas causado por el estímulo con las EVs de las células de cáncer de mama, ya que no se evaluó el efecto del estímulo solo con las EVs, en ausencia de FN. De acuerdo con lo reportado en la literatura, la migración de las células MDA-MB-231 sin tratamiento con EVs en ausencia de FN se redujo, respecto de la condición control en la que sí se usó FN. Por otra parte, el tratamiento con las EVs que contienen TNC aumentó la migración solamente en presencia de FN (Figura 23). El hecho de que la migración no aumentó con el tratamiento con las EVs que contienen TNC en ausencia de FN tiene 2 posibles interpretaciones: (i) El tratamiento con las EVs no activa integrinas o (ii) la ausencia de FN en el experimento afecta la persistencia (distancia neta/total) [105] y/o la direccionalidad (% de células orientadas) de la migración [106] de tal forma que el tratamiento con las EVs no se traduce en un aumento de la migración. El anticuerpo no relacionado (HA) no modificó la migración ratificando la importancia que tiene la activación de integrinas en la migración de las células de cáncer de mama. Las diferencias en la reducción de la migración de las células tratadas con el anticuerpo bloqueante de integrina $\alpha\beta3$ y del péptido RGD pueden ser explicadas por la diferencia de especificidad de ambas moléculas. Mientras que el anticuerpo es específico para integrina $\alpha\beta3$, el péptido RGD es un inhibidor no específico de las interacciones

integrina-ligando que contienen el motivo de unión RGD, entre los que podemos encontrar los heterodímeros $\alpha\beta3$ [107, 108], $\alpha\beta6$ [108], $\alpha\beta1$ [98] y $\alpha5\beta1$ [99] con presencia reportada en las células MDA-MB-231. La reducción en la migración de las células MDA-MB-231 tratadas con el péptido RGD es mayor porque esta molécula inhibe más interacciones entre heterodímeros de integrina y FN, en comparación al anticuerpo que bloquea solamente integrina $\alpha\beta3$. El uso de anticuerpos bloqueantes de integrina $\alpha\beta3$ se ha reportado anteriormente, mediante el estudio de Intertumumab, un anticuerpo monoclonal humano contra la subunidad de integrina α . Intertumumab inhibió la migración e invasión de células de cáncer de mama [109]. Adicionalmente, se informaron resultados prometedores en un ensayo clínico de fase I usando Intertumumab sólo en pacientes con tumores sólidos [109] y en un ensayo clínico de fase II en combinación con Dacarbazina en pacientes con melanoma [110]. Sin embargo, otro estudio clínico de fase II en pacientes con cáncer de próstata con Intertumumab, en combinación con docetaxel y prednisona, concluyó que la supervivencia general fue superior en el grupo de control tratado con placebo [111], lo que llevó a la suspensión del uso de este anticuerpo como posible fármaco contra el cáncer. A pesar de los desalentadores resultados en los ensayos clínicos, los estudios realizados con modelos preclínicos posicionan a integrina $\alpha\beta3$ como un blanco farmacológico atractivo en el tratamiento del cáncer.

3.2: Estudio de la localización de TNC y CAV1 en las EVs de células MDA-MB-231

Las EVs pueden originar respuestas celulares sin la necesidad de ser internalizados en una célula mediante los mecanismos de señalización soluble y/o yuxtacrina. Se consideran estos mecanismos debido a que: (i) el tratamiento con las EVs *in situ* aumentó la migración de las células MDA-MB-231 WT y T-47D (Figura 17), (ii) la captación de las EVs en las células MDA-MB-231 WT incubadas durante 3 h es muy baja (Figura 20) y (iii) se ha reportado que la estimulación durante 1 h con exosomas/microvesículas activó de la señalización intracelular dependiente de integrinas [87]. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la posibilidad de que TNC contenida en las EVs de las células MDA-MB-231 sea capaz de activar a integrina $\alpha\beta3$ a través de un proceso de señalización soluble o yuxtacrina, está condicionada a demostrar que TNC está localizada en la superficie de las EVs. Se realizaron ensayos de digestión con tripsina en presencia y ausencia de detergente en muestras de EVs

de las células MDA-MB-231 WT. En base al conocimiento sobre la topología de proteínas en las EVs se pueden considerar los siguientes controles: Alix es una proteína localizada en la superficie de las EVs [112], y por ello susceptible a la proteólisis mediante el tratamiento solo con la tripsina; TSG101 es una proteína localizada en el interior de las EVs [113], resistente a proteólisis mediante el tratamiento solo con tripsina, pero susceptible a la proteólisis mediante el tratamiento con detergente y tripsina y CD81 es una proteína que se ha descrito como resistente al tratamiento con tripsina y detergente en muestras de EVs [114]. Se ha postulado que la palmitoilación de CD81 reduce el acceso de la proteasa y que el plegamiento del dominio extracelular contribuye a la resistencia a la proteasa [115]. TNC y CAV1 fueron detectadas en las muestras tratadas solo con tripsina, por lo tanto, se localizan en el interior de las EVs (Figura 24). Este resultado descarta la posibilidad de que TNC pueda activar a integrina $\alpha\beta3$ mediante los mecanismos de señalización soluble y/o yuxtacrina.

La proteólisis de las proteínas localizadas en la superficie de las EVs causa una pérdida de su funcionalidad (Figura 25). Como se mencionó anteriormente, se ha propuesto que las proteínas localizadas en la superficie de las EVs y en las células receptoras [94] están involucradas en su captación. El tratamiento con tripsina causa una proteólisis no selectiva de las proteínas localizadas en la superficie de las EVs, lo que impide la interacción de las EVs con las proteínas de la superficie celular. Consecuentemente, podría hipotetizarse que la pérdida de la funcionalidad de las EVs se deba a una reducción en su captación, lo que inhibe la entrega a la célula de proteínas localizadas en el interior de las EVs, como CAV1 y TNC.

El análisis proteómico de las EVs con CAV1 y TNC (WT, shC y shLUC) reveló la presencia de una única proteína común en estos tres conjuntos: TAGLN-2. Se ha descrito que TAGLN-2 activa mediante señalización “de adentro hacia afuera” a integrina $\alpha\beta2$ [116]. Al revisar la secuencia de aminoácidos de TAGLN-2 se encuentra un motivo Leucina - Ác. Aspártico - Valina (LDV), propio de los ligandos de integrina $\alpha\beta2$, y un motivo Serina - Glicina - Ác. Aspártico (SGD) [117]. Los ligandos de integrinas pueden poseer una secuencia de tripéptidos diferente a RGD, pero relacionada, generalmente con el ácido aspártico conservado [60]. La similitud del motivo SGD con el motivo RGD podría ofrecer una explicación al aumento de la migración de las células a tiempos cortos de estimulación con las EVs a través de la activación de integrina $\alpha\beta3$, ya que TAGLN-2 solo se encontró en las

EVs de células MDA-MB-231 WT y shLUC y además podría estar localizada en su superficie.

Objetivo Específico 4

4.1: Ensayo de formación de redes vasculares en células EA.hy 926 estimuladas con EVs de células de cáncer de mama con y sin TNC

Las células de cáncer necesitan recibir nutrientes y eliminar los desechos metabólicos. Por lo tanto, aumentan la generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes (angiogénesis) [118]. La migración de células endoteliales durante la angiogénesis es el resultado integrado de 3 mecanismos de migración direccional: quimiotaxis, la migración hacia un gradiente de quimioatrayentes solubles; haptotaxis, la migración hacia un gradiente de ligandos inmovilizados; y mecanotaxis, la migración generada por fuerzas mecánicas. Por lo general, la haptotaxis se asocia con una mayor migración de células endoteliales en respuesta a la unión de integrinas a componentes de ECM [119]. La generación de vasos sanguíneos tumorales inducida por TNC podría estar relacionada con su efecto sobre las células endoteliales [120]. La reducción en el nivel de expresión de TNC disminuyó la formación de redes vasculares en células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVECs). Además, en el mismo estudio se demostró que el uso del medio condicionado por MEFs que expresan TNC, aumenta la formación de redes vasculares de las HUVECs, en comparación al medio condicionado por MEFs que no expresan TNC [121]. El uso de TNC, como proteína purificada, aumentó la formación de redes vasculares en las células endoteliales retinianas humanas (HRECs) de una forma dependiente de la concentración utilizada (30-300 ng/ml) [50]. Otro estudio utilizando el mismo modelo celular demostró que la reducción del nivel de TNC mediante el uso de siRNA también redujo formación de redes vasculares [122]. Estos antecedentes, sumados al efecto promigratorio de las EVs con TNC mostrado en el primer objetivo de este trabajo, plantean la posibilidad de que uno de los mecanismos utilizados por las células de cáncer para dar lugar a la angiogénesis, sea mediante la comunicación celular hacia las células endoteliales a través de EVs que contienen TNC. Es necesario aclarar que la técnica de estudio utilizada corresponde a una aproximación experimental *in vitro*, ya que la angiogénesis tiene lugar *in vivo*. El tratamiento con las EVs que contienen TNC (WT y shLUC) aumentó el porcentaje de redes vinculadas de forma dosis

dependiente. En las EVs sin TNC, ninguna de las condiciones ensayadas mostró ser distinta a la condición control sin tratamiento (Figura 26). Estos resultados apoyan un rol proangiogénico de TNC contenida en las EVs y sugieren que pueden contribuir al desarrollo tumoral a través de sus efectos en variados tipos celulares. No se ha encontrado evidencia en la literatura que mencione previamente el rol proangiogénesis de TNC en un mecanismo de comunicación celular vía EVs.

5 – CONCLUSIONES

Las EVs de las células de cáncer de mama metastásico MDA-MB-231 que contienen TNC aumentan la migración e invasión *in vitro* de las mismas células, así como también de las células de cáncer de mama no metastásico.

En las células MDA-MB-231 la captación de sus EVs no depende de TNC contenida en las EVs. Por otra parte, se estudió el efecto de inhibidores farmacológicos de integrinas en este proceso: el anticuerpo bloqueante de integrina $\alpha\beta3$ redujo la captación de las EVs, mientras que el péptido RGD no demostró efecto.

Ambos inhibidores farmacológicos previnieron el aumento de la migración de las células tratadas con las EVs con CAV1 y TNC. Se demostró que TNC y CAV1 están localizadas en el lumen de las EVs, descartando la posibilidad de que TNC active a integrina $\alpha\beta3$ mediante los mecanismos de señalización que no requieran de la captación de las EVs.

Finalmente, se demostró que las EVs con TNC aumentan la formación de redes vasculares *in vitro* en las células endoteliales.

En resumen, en este trabajo se evidenció la importancia de TNC contenida en las EVs de las células de cáncer de mama como un factor que favorece la progresión de la enfermedad. Importante también, desde un punto de vista terapéutico, es la inhibición de la captación de EVs via integrina $\alpha\beta3$ que se observa al usar agentes farmacológicos.

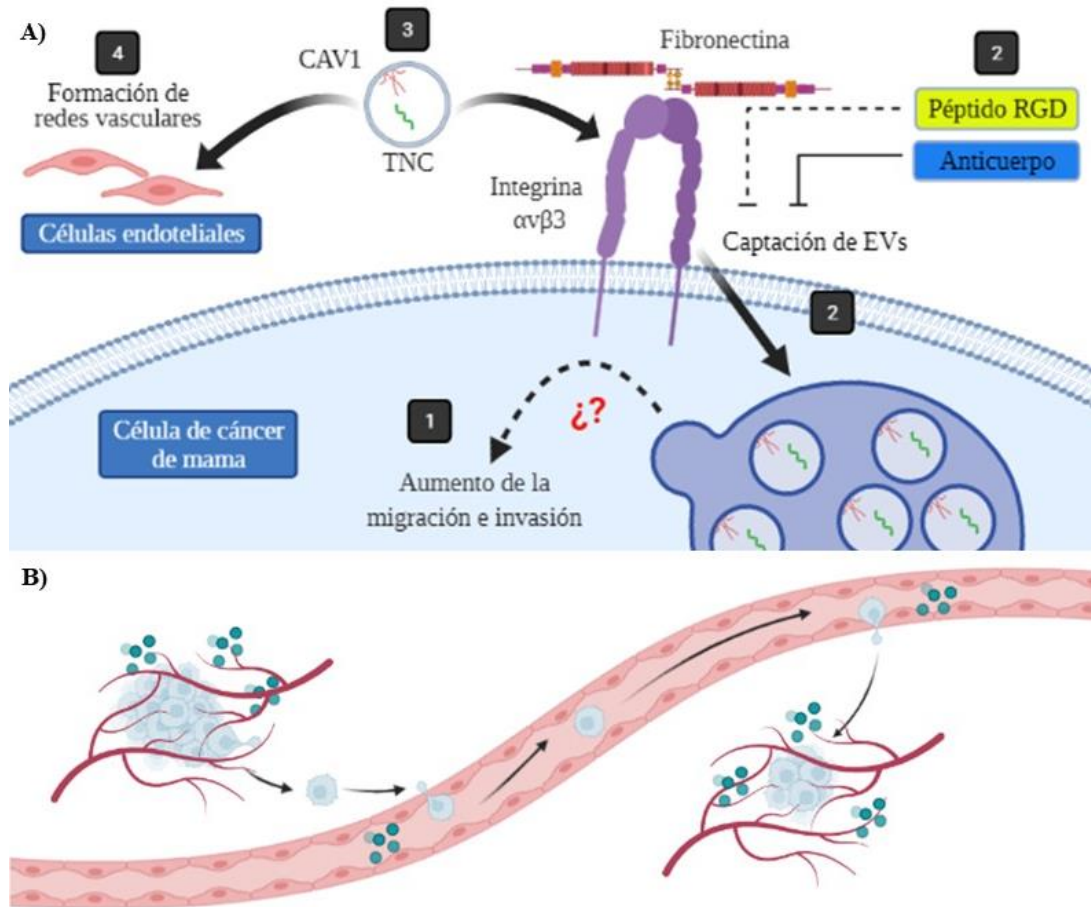


Figura 27. Modelo esquemático resumen de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis. A) Las EVs con CAV1 y TNC aumentan la migración e invasión de las células de cáncer de mama (1). Las EV son captadas por las células de cáncer de mama y el uso de inhibidores farmacológicos tiene diferentes efectos en la captación de las EVs (2). TNC y CAV1 están localizadas en el interior de las EVs y el aumento de la migración mediado por las EVs requiere la presencia de Fibronectina (3). Las EVs con TNC aumentan la formación de redes vasculares de las células endoteliales (4). B) Las EVs con TNC (verde) promueven la metástasis de células de cáncer de mama (celeste) y angiogénesis de células endoteliales (rojo).

6 – REFERENCIAS

1. *Breast cancer*. 2021 [cited 2021 October 8th]; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>.
2. Icaza, G., L. Núñez, and H. Bugueño, *Descripción epidemiológica de la mortalidad por cáncer de mama en mujeres en Chile*. Revista médica de Chile, 2017. **145**: p. 106-114.
3. Banegas, M.P., et al., *Perceived and objective breast cancer risk assessment in Chilean women living in an underserved area*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2012. **21**(10): p. 1716-21.
4. Observatory, G.C. *Chile*. 2020 [cited 2021 October 11th]; Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/152-chile-fact-sheets.pdf>.
5. Valastyan, S. and R.A. Weinberg, *Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms*. Cell, 2011. **147**(2): p. 275-92.
6. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
7. Lacroix, M., *Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells*. Endocr Relat Cancer, 2006. **13**(4): p. 1033-67.
8. Ravid, D., et al., *Caveolin-1 inhibits anoikis and promotes survival signaling in cancer cells*. Adv Enzyme Regul, 2006. **46**: p. 163-75.
9. Núñez-Wehinger, S., et al., *Caveolin-1 in cell migration and metastasis*. Curr Mol Med, 2014. **14**(2): p. 255-74.
10. Logozzi, M., et al., *High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients*. PloS one, 2009. **4**(4): p. e5219-29.
11. Nwosu, Z.C., et al., *Caveolin-1 in the regulation of cell metabolism: a cancer perspective*. Molecular cancer, 2016. **15**(1): p. 71-83.
12. Okamoto, T., et al., *Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(10): p. 5419-5422.
13. Dietzen, D.J., W.R. Hastings, and D.M. Lublin, *Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(12): p. 6838-6842.
14. Sun, X.-H., et al., *Identification of a novel domain at the N-terminus of caveolin-1 that controls rear polarization of the protein and caveolae formation*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**: p. 7232-41.
15. Quest, A.F., J.L. Gutierrez-Pajares, and V.A. Torres, *Caveolin-1: an ambiguous partner in cell signalling and cancer*. Journal of cellular and molecular medicine, 2008. **12**(4): p. 1130-1150.
16. FG Quest, A., et al., *The caveolin-1 connection to cell death and survival*. Current molecular medicine, 2013. **13**(2): p. 266-281.
17. Lorena Lobos-González, L.A., Gonzalo Fernández, Carlos Sanhueza and Andrew F.G Quest, *Advances in Malignant Melanoma - Clinical and Research Perspectives*, ed. D.A. Armstrong. 2011.
18. Kogo, H., T. Aiba, and T. Fujimoto, *Cell type-specific occurrence of caveolin-1 α and-1 β in the lung caused by expression of distinct mRNAs*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(24): p. 25574-25581.

19. Goetz, J.G., et al., *Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly*. Cancer and metastasis reviews, 2008. **27**(4): p. 715-735.
20. Yang, G., et al., *Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer*. Clin Cancer Res, 1998. **4**(8): p. 1873-80.
21. Bartz, R., et al., *Caveolin-1 secreting LNCaP cells induce tumor growth of caveolin-1 negative LNCaP cells in vivo*. International journal of cancer, 2008. **122**(3): p. 520-525.
22. Bender, F.C., et al., *Caveolin-1 levels are down-regulated in human colon tumors, and ectopic expression of caveolin-1 in colon carcinoma cell lines reduces cell tumorigenicity*. Cancer Res, 2000. **60**(20): p. 5870-8.
23. Lavie, Y., G. Fiucci, and M. Liscovitch, *Up-regulation of caveolae and caveolar constituents in multidrug-resistant cancer cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(49): p. 32380-3.
24. Lavie, Y. and M. Liscovitch, *Changes in lipid and protein constituents of rafts and caveolae in multidrug resistant cancer cells and their functional consequences*. Glycoconj J, 2000. **17**(3 -4): p. 253-9.
25. Díaz, J., et al., *A novel caveolin-1/p85 α /Rab5/Tiam1/Rac1 signaling axis in tumor cell migration and invasion*. Communicative & integrative biology, 2014. **7**(5): p. e972850.
26. Urra, H., et al., *Caveolin-1-enhanced motility and focal adhesion turnover require tyrosine-14 but not accumulation to the rear in metastatic cancer cells*. PloS one, 2012. **7**(4): p. e33085.
27. Joshi, B., et al., *Phosphorylated caveolin-1 regulates Rho/ROCK-dependent focal adhesion dynamics and tumor cell migration and invasion*. Cancer research, 2008. **68**(20): p. 8210-8220.
28. Syn, N., et al., *Exosome-mediated metastasis: From epithelial–mesenchymal transition to escape from immunosurveillance*. Trends in pharmacological sciences, 2016. **37**(7): p. 606-617.
29. van Niel, G., G. D'Angelo, and G. Raposo, *Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2018. **19**(4): p. 213-218.
30. Johnstone, R.M., et al., *Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)*. J Biol Chem, 1987. **262**(19): p. 9412-20.
31. Tricarico, C., J. Clancy, and C. D'Souza-Schorey, *Biology and biogenesis of shed microvesicles*. Small GTPases, 2017. **8**(4): p. 220-232.
32. Valenti, R., et al., *Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor- β -mediated suppressive activity on T lymphocytes*. Cancer research, 2006. **66**(18): p. 9290-9298.
33. Zhang, X., et al., *Exosomes in cancer: small particle, big player*. Journal of hematology & oncology, 2015. **8**(1): p. 83-96.
34. Bergmann, C., et al., *Tumor-derived microvesicles in sera of patients with head and neck cancer and their role in tumor progression*. Head & neck, 2009. **31**(3): p. 371-380.
35. He, M., et al., *Hepatocellular carcinoma-derived exosomes promote motility of immortalized hepatocyte through transfer of oncogenic proteins and RNAs*. Carcinogenesis, 2015. **36**(9): p. 1008-18.

36. Harris, D.A., et al., *Exosomes released from breast cancer carcinomas stimulate cell movement*. PloS one, 2015. **10**(3): p. e0117495-e0117495.
37. Kang, J., et al., *Caveolin-1 Modulates Docetaxel-Induced Cell Death in Breast Cancer Cell Subtypes through Different Mechanisms*. Cancer research and treatment, 2016. **48**(2): p. 715-726.
38. Campos, A., et al., *Caveolin-1-containing extracellular vesicles transport adhesion proteins and promote malignancy in breast cancer cell lines*. Nanomedicine, 2018. **13**(20): p. 2597-2609.
39. Adams, M., et al., *Changes in tenascin-C isoform expression in invasive and preinvasive breast disease*. Cancer Res, 2002. **62**(11): p. 3289-97.
40. Albacete-Albacete, L., et al., *ECM deposition is driven by caveolin-1-dependent regulation of exosomal biogenesis and cargo sorting*. The Journal of cell biology, 2020. **219**(11): p. e202006178.
41. Chiquet-Ehrismann, R., et al., *Tenascins in stem cell niches*. Matrix Biology, 2014. **37**: p. 112-123.
42. Midwood, K.S., et al., *Advances in tenascin-C biology*. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 2011. **68**(19): p. 3175-3199.
43. Borsi, L., et al., *Expression of different tenascin isoforms in normal, hyperplastic and neoplastic human breast tissues*. Int J Cancer, 1992. **52**(5): p. 688-92.
44. Ghert, M.A., et al., *Tenascin-C splice variant adhesive/anti-adhesive effects on chondrosarcoma cell attachment to fibronectin*. Cell Struct Funct, 2001. **26**(3): p. 179-87.
45. Suwihat, S., et al., *Expression of Extracellular Matrix Components Versican, Chondroitin Sulfate, Tenascin, and Hyaluronan, and Their Association with Disease Outcome in Node-Negative Breast Cancer*. Clinical Cancer Research, 2004. **10**(7): p. 2491-2498.
46. Oskarsson, T., et al., *Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs*. Nature medicine, 2011. **17**(7): p. 867-874.
47. Naik, A., et al., *Neuropilin-1 promotes the oncogenic Tenascin-C/integrin β 3 pathway and modulates chemoresistance in breast cancer cells*. BMC cancer, 2018. **18**(1): p. 533-533.
48. Qian, S., et al., *Exosomal Tenascin-c induces proliferation and invasion of pancreatic cancer cells by WNT signaling*. OncoTargets and therapy, 2019. **12**: p. 3197-3205.
49. Kalembeysi, I., et al., *Tenascin-C upregulates matrix metalloproteinase-9 in breast cancer cells: Direct and synergistic effects with transforming growth factor β 1*. International Journal of Cancer, 2003. **105**(1): p. 53-60.
50. Kobayashi, Y., et al., *Tenascin-C promotes angiogenesis in fibrovascular membranes in eyes with proliferative diabetic retinopathy*. Mol Vis, 2016. **22**: p. 436-45.
51. Behrem, S., et al., *Distribution pattern of tenascin-C in glioblastoma: correlation with angiogenesis and tumor cell proliferation*. Pathol Oncol Res, 2005. **11**(4): p. 229-35.
52. Ji, H., et al., *Proteome profiling of exosomes derived from human primary and metastatic colorectal cancer cells reveal differential expression of key metastatic factors and signal transduction components*. Proteomics, 2013. **13**(10-11): p. 1672-86.
53. Zheng, J., et al., *Extracellular matrix proteins and carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules characterize pancreatic duct fluid exosomes in patients with*

- pancreatic cancer*. HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association, 2018. **20**(7): p. 597-604.
54. Mirzaei, R., et al., *Brain tumor-initiating cells export tenascin-C associated with exosomes to suppress T cell activity*. OncoImmunology, 2018. **7**(10): p. e1478647.
 55. Yoshida, T., T. Akatsuka, and K. Imanaka-Yoshida, *Tenascin-C and integrins in cancer*. Cell adhesion & migration, 2015. **9**(1-2): p. 96-104.
 56. Lino, R.L.B., et al., *Alphavbeta3 integrin blocking inhibits apoptosis and induces autophagy in murine breast tumor cells*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2019. **1866**(12): p. 118536.
 57. Fuentes, P., et al., *ITGB3-mediated uptake of small extracellular vesicles facilitates intercellular communication in breast cancer cells*. Nature Communications, 2020. **11**(1): p. 4261.
 58. Beauvais, D.M., B.J. Burbach, and A.C. Rapraeger, *The syndecan-1 ectodomain regulates alphavbeta3 integrin activity in human mammary carcinoma cells*. The Journal of cell biology, 2004. **167**(1): p. 171-181.
 59. Niewiarowski, S., et al., *Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors*. Seminars in hematology, 1994. **31**(4): p. 289-300.
 60. David, V., et al., *Recombinant and Chimeric Disintegrins in Preclinical Research*. Toxins, 2018. **10**(8): p. 321.
 61. Barja-Fidalgo, C., et al., *Disintegrins: integrin selective ligands which activate integrin-coupled signaling and modulate leukocyte functions*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2005. **38**: p. 1513-1520.
 62. Mi, Z., et al., *Osteopontin promotes CCL5-mesenchymal stromal cell-mediated breast cancer metastasis*. Carcinogenesis, 2011. **32**(4): p. 477-487.
 63. Liu, C., et al., *Extracellular gamma-synuclein promotes tumor cell motility by activating $\beta 1$ integrin-focal adhesion kinase signaling pathway and increasing matrix metalloproteinase-24, -2 protein secretion*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2018. **37**(1): p. 117.
 64. Mikami, J., et al., *I-branching N-acetylglucosaminyltransferase regulates prostate cancer invasiveness by enhancing $\alpha 5\beta 1$ integrin signaling*. Cancer Sci, 2016. **107**(3): p. 359-68.
 65. Chinot, O.L., *Cilengitide in glioblastoma: when did it fail?* The Lancet Oncology, 2014. **15**(10): p. 1044-1045.
 66. McKelvey, K.J., et al., *Exosomes: Mechanisms of Uptake*. Journal of Circulating Biomarkers, 2015. **4**: p. 7.
 67. Rognoni, E., R. Ruppert, and R. Fässler, *The kindlin family: functions, signaling properties and implications for human disease*. Journal of Cell Science, 2016. **129**(1): p. 17.
 68. Cheah, M. and M.R. Andrews, *Integrin Activation: Implications for Axon Regeneration*. Cells, 2018. **7**(3): p. 20.
 69. Zhang, J.-F., et al., *IL-33/ST2 axis promotes glioblastoma cell invasion by accumulating tenascin-C*. Scientific reports, 2019. **9**(1): p. 20276-20276.
 70. Théry, C., et al., *Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids*. Curr Protoc Cell Biol, 2006. **Chapter 3**: p. Unit 3.22.

71. Costa Verdera, H., et al., *Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis*. J Control Release, 2017. **266**: p. 100-108.
72. Shimoda, A., et al., *Exosomes as nanocarriers for systemic delivery of the Helicobacter pylori virulence factor CagA*. Scientific reports, 2016. **6**: p. 18346-18346.
73. Steinle, H., et al., *Improving the Angiogenic Potential of EPCs via Engineering with Synthetic Modified mRNAs*. Mol Ther Nucleic Acids, 2018. **13**: p. 387-398.
74. Shao, B., et al., *A Cluster of Proteins Implicated in Kidney Disease Is Increased in High-Density Lipoprotein Isolated from Hemodialysis Subjects*. Journal of proteome research, 2015. **14**(7): p. 2792-2806.
75. Luczak, J.A., S.D. Redick, and J.E. Schwarzbauer, *A single cysteine, Cys-64, is essential for assembly of tenascin-C hexabrachions*. J Biol Chem, 1998. **273**(4): p. 2073-7.
76. Théry, C. and K.W. Witwer, *Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines*. 2018. **7**(1): p. 1535750.
77. Lin, C.-J., et al., *The paracrine induction of prostate cancer progression by caveolin-1*. Cell death & disease, 2019. **10**(11): p. 834-834.
78. Mol, E.A., et al., *Higher functionality of extracellular vesicles isolated using size-exclusion chromatography compared to ultracentrifugation*. Nanomedicine, 2017. **13**(6): p. 2061-2065.
79. ExoCarta. *List of top 100 proteins that are often identified in exosomes*. 2021 [cited 2021 October 31]; Available from: http://exocarta.org/exosome_markers_new.
80. Semina, S.E., et al., *Exosome-Mediated Transfer of Cancer Cell Resistance to Antiestrogen Drugs*. Molecules (Basel, Switzerland), 2018. **23**(4): p. 829.
81. Lobb, R.J., et al., *Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma*. Journal of extracellular vesicles, 2015. **4**: p. 27031-27031.
82. de Gassart, A., et al., *Lipid raft-associated protein sorting in exosomes*. Blood, 2003. **102**(13): p. 4336-4344.
83. Joester, A. and A. Faissner, *The structure and function of tenascins in the nervous system*. Matrix Biology, 2001. **20**(1): p. 13-22.
84. Gulcher, J.R., et al., *An alternatively spliced region of the human hexabrachion contains a repeat of potential N-glycosylation sites*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1989. **86**(5): p. 1588-1592.
85. Kruse, C.R., et al., *The effect of pH on cell viability, cell migration, cell proliferation, wound closure, and wound reepithelialization: In vitro and in vivo study*. Wound Repair Regen, 2017. **25**(2): p. 260-269.
86. Chen, C.-Y., et al., *CCN1 Induces Oncostatin M Production in Osteoblasts via Integrin-Dependent Signal Pathways*. PLoS ONE, 2014. **9**(9): p. e106632.
87. Hur, Y.H., et al., *Embryonic Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Maintain ESC Stemness by Activating FAK*. Dev Cell, 2021. **56**(3): p. 277-291.e6.
88. Nagaharu, K., et al., *Tenascin C induces epithelial-mesenchymal transition-like change accompanied by SRC activation and focal adhesion kinase phosphorylation in human breast cancer cells*. The American journal of pathology, 2011. **178**(2): p. 754-763.

89. Ramírez-Ricardo, J., et al., *Circulating extracellular vesicles from patients with breast cancer enhance migration and invasion via a Src-dependent pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells*. *Molecular medicine reports*, 2020. **22**(3): p. 1932-1948.
90. Tsai, M.-S., et al., *Expression and Function of CYR61, an Angiogenic Factor, in Breast Cancer Cell Lines and Tumor Biopsies*. *Cancer Research*, 2000. **60**(20): p. 5603.
91. Hellinger, J.W., et al., *Inhibition of CYR61-S100A4 Axis Limits Breast Cancer Invasion*. *Frontiers in oncology*, 2019. **9**: p. 1074-1074.
92. Mathieu, M., et al., *Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication*. *Nature Cell Biology*, 2019. **21**(1): p. 9-17.
93. Mulcahy, L.A., R.C. Pink, and D.R.F. Carter, *Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake*. *Journal of extracellular vesicles*, 2014. **3**: p. 10.3402/jev.v3.24641.
94. Hoshino, A., et al., *Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis*. *Nature*, 2015. **527**(7578): p. 329-35.
95. Shimomura, T., et al., *New Lipophilic Fluorescent Dyes for Exosome Labeling: Monitoring of Cellular Uptake of Exosomes*. *bioRxiv*, 2020: p. 2020.02.02.931295.
96. Abcam. *Anti-Integrin alpha V beta 3 antibody [27.1 (VNR-1)] (ab78289)*. 2021 [cited 2021 31-10-2021]; Available from: <https://www.abcam.com/integrin-alpha-v-beta-3-antibody-271-vnr-1-ab78289.html?productWallTab=ShowAll>.
97. Ortiz, R., et al., *Extracellular matrix-specific Caveolin-1 phosphorylation on tyrosine 14 is linked to augmented melanoma metastasis but not tumorigenesis*. *Oncotarget*, 2016. **7**(26): p. 40571-40593.
98. Meyer, T., J.F. Marshall, and I.R. Hart, *Expression of alphav integrins and vitronectin receptor identity in breast cancer cells*. *Br J Cancer*, 1998. **77**(4): p. 530-6.
99. Shroff, K. and E. Kokkoli, *PEGylated Liposomal Doxorubicin Targeted to $\alpha 5\beta 1$ -Expressing MDA-MB-231 Breast Cancer Cells*. *Langmuir*, 2012. **28**(10): p. 4729-4736.
100. Humphries, J.D., A. Byron, and M.J. Humphries, *Integrin ligands at a glance*. *J Cell Sci*, 2006. **119**(Pt 19): p. 3901-3.
101. Campbell, I.D. and M.J. Humphries, *Integrin structure, activation, and interactions*. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2011. **3**(3): p. a004994.
102. Reth, M., *Matching cellular dimensions with molecular sizes*. *Nat Immunol*, 2013. **14**(8): p. 765-7.
103. Ching, C.B., K. Hidajat, and M.S. Uddin, *Evaluation of Equilibrium and Kinetic Parameters of Smaller Molecular Size Amino Acids on KX Zeolite Crystals via Liquid Chromatographic Techniques*. *Separation Science and Technology*, 1989. **24**(7-8): p. 581-597.
104. Deryugina, E.I. and M.A. Bourdon, *Tenascin mediates human glioma cell migration and modulates cell migration on fibronectin*. *J Cell Sci*, 1996. **109** (Pt 3): p. 643-52.
105. Huveneers, S. and E.H.J. Danen, *Adhesion signaling – crosstalk between integrins, Src and Rho*. *Journal of Cell Science*, 2009. **122**(8): p. 1059-1069.
106. Montenegro, C.F., et al., *Inhibition of $\alpha v\beta 3$ integrin induces loss of cell directionality of oral squamous carcinoma cells (OSCC)*. *PloS one*, 2017. **12**(4): p. e0176226-e0176226.

107. Gomes, N., et al., *Breast adenocarcinoma cell adhesion to the vascular subendothelium in whole blood and under flow conditions: effects of alphavbeta3 and alphaIIbbeta3 antagonists*. Clin Exp Metastasis, 2004. **21**(6): p. 553-61.
108. Singh, C., et al., *Integrin expression and glycosylation patterns regulate cell-matrix adhesion and alter with breast cancer progression*. Biochem Biophys Res Commun, 2018. **499**(2): p. 374-380.
109. Chen, Q., et al., *CNTO 95, a fully human anti α v integrin antibody, inhibits cell signaling, migration, invasion, and spontaneous metastasis of human breast cancer cells*. Clinical & Experimental Metastasis, 2008. **25**(2): p. 139-148.
110. O'Day, S., et al., *A randomised, phase II study of intetumumab, an anti- α v-integrin mAb, alone and with dacarbazine in stage IV melanoma*. British journal of cancer, 2011. **105**(3): p. 346-352.
111. Heidenreich, A., et al., *A randomized, double-blind, multicenter, phase 2 study of a human monoclonal antibody to human α v integrins (intetumumab) in combination with docetaxel and prednisone for the first-line treatment of patients with metastatic castration-resistant prostate cancer*. Ann Oncol, 2013. **24**(2): p. 329-336.
112. Zhang, Y., et al., *Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential*. Cell Biosci, 2019. **9**: p. 19-37.
113. Cvjetkovic, A., et al., *Detailed Analysis of Protein Topology of Extracellular Vesicles-Evidence of Unconventional Membrane Protein Orientation*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 36338.
114. Tang, X., et al., *Tumour-Secreted Hsp90 α on External Surface of Exosomes Mediates Tumour - Stromal Cell Communication via Autocrine and Paracrine Mechanisms*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 15108.
115. Choi, D., et al., *Quantitative proteomic analysis of trypsin-treated extracellular vesicles to identify the real-vesicular proteins*. Journal of extracellular vesicles, 2020. **9**(1): p. 1757209-1757209.
116. Jeon, B.-N., et al., *Actin stabilizer TAGLN2 potentiates adoptive T cell therapy by boosting the inside-out costimulation via lymphocyte function-associated antigen-1*. Oncoimmunology, 2018. **7**(12): p. e1500674-e1500674.
117. UniProt. UniProtKB - P37802 (TAGL2_HUMAN). 2021 [cited 2021 28 de noviembre]; Available from: <https://www.uniprot.org/uniprot/P37802>.
118. Brösicke, N. and A. Faissner, *Role of tenascins in the ECM of gliomas*. Cell Adh Migr, 2015. **9**(1-2): p. 131-40.
119. Lamalice, L., F. Le Boeuf, and J. Huot, *Endothelial cell migration during angiogenesis*. Circ Res, 2007. **100**(6): p. 782-94.
120. Canfield, A.E. and A.M. Schor, *Evidence that tenascin and thrombospondin-1 modulate sprouting of endothelial cells*. J Cell Sci, 1995. **108** (Pt 2): p. 797-809.
121. Rupp, T., et al., *Tenascin-C Orchestrates Glioblastoma Angiogenesis by Modulation of Pro- and Anti-angiogenic Signaling*. Cell Rep, 2016. **17**(10): p. 2607-2619.
122. Kubo, Y., et al., *Periostin and tenascin-C interaction promotes angiogenesis in ischemic proliferative retinopathy*. Scientific Reports, 2020. **10**(1): p. 9299.

7 – ANEXO

Utilizando siARN se redujo los niveles de expresión Cyr61 en células MDA-MB-231 WT aproximadamente en un 80% en comparación al tratamiento con siARN Control y con el reactivo de transfección siPORT (Figura Suplementaria 1A). Luego, se evaluó la migración celular durante 2 h. La disminución transitoria en los niveles de Cyr61 redujo la migración en 50% en comparación con el siControl y el reactivo siPORT (Figura Suplementaria 1B). Luego, se utilizaron partículas lentivirales para generar el silenciamiento estable de Cyr61 mediante el uso del vector de expresión lentiviral pLVX-IRES-ZsGreen1 que permite la expresión simultánea del shARN contra Cyr61 y la proteína verde fluorescente ZsGreen1 que se utilizó para la selección por citometría de flujo. A continuación, se estudió la estabilidad del silenciamiento de Cyr61. El nivel de Cyr61 en las células transducidas con el shARN control (shLUC) es estable a lo largo del tiempo. Por otra parte, el nivel de Cyr61 en las células transducidas con shARN contra Cyr61, muestra una gran variabilidad y una tendencia general al aumento a lo largo de los pasajes celulares 3 – 6 (Figura Suplementaria 1C y D). Estos resultados indican que el silenciamiento de Cyr61 no es estable en el tiempo.

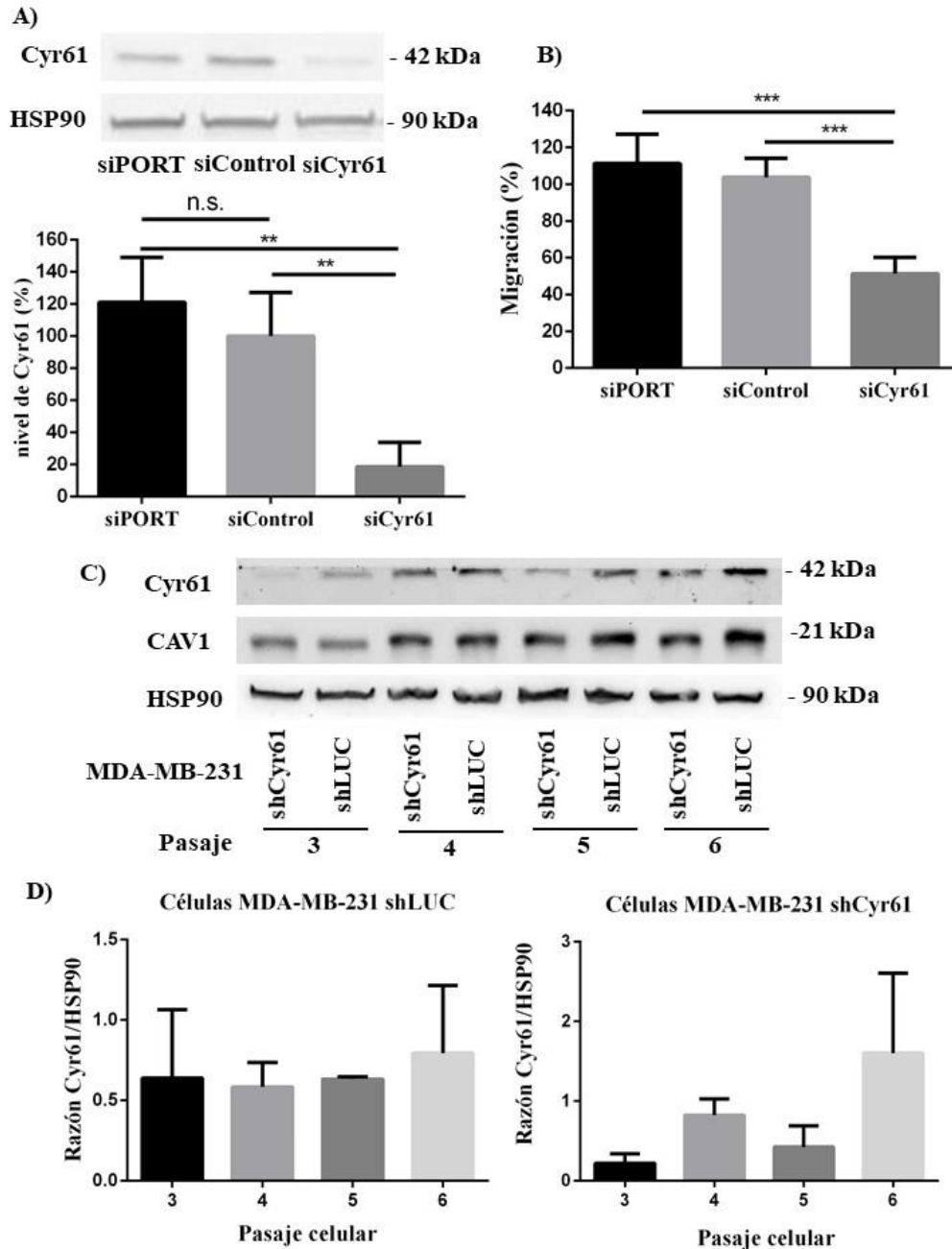


Figura Suplementaria 1. Silenciamiento de Cyr61 en las células MDA-MB-231. A) Western blot y cuantificación de los niveles de Cyr61 en las células MDA-MB-231 que fueron tratadas con siARN contra Cyr61, siARN control o solo con el reactivo de transfección siPORT; B) ensayo de migración celular; C) Western blot de los niveles de Cyr61 en los pasajes 3, 4, 5 y 6 después de la selección utilizando citometría de flujo; y D) Razón Cyr61/HSP90 en células MDA-MB-231 shLUC y shCyr61. (n=3). Los datos se presentan como el promedio \pm SEM en A y D y como promedio \pm SD en B. n. s., no significativo; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

Se utilizaron las células de cáncer de mama T-47D y MDA-MB-231 (WT, shControl y shCAV1) para evaluar el nivel de expresión de la integrina $\beta 3$ y CAV1. Los resultados sugieren que los niveles de integrina $\beta 3$ no son dependientes de la presencia de CAV1 en células de cáncer de mama (Figura Suplementaria 2).

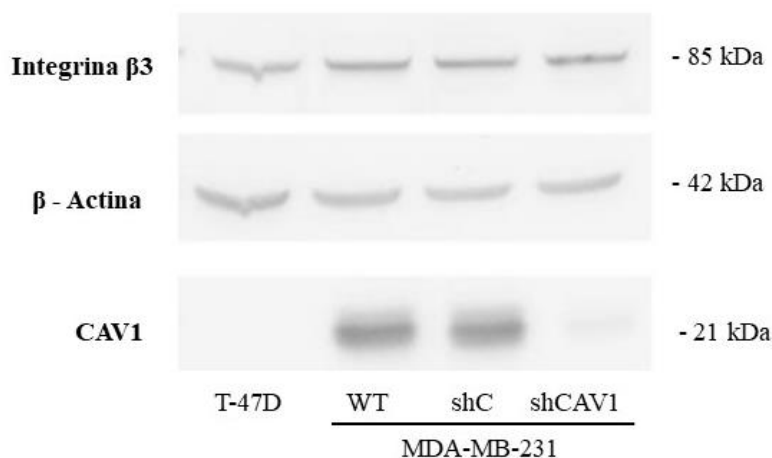


Figura Suplementaria 2. Expresión de integrina $\beta 3$ en células de cáncer de mama. A) Se evaluó los niveles de expresión de integrina $\beta 3$ y CAV1 en las líneas celulares de cáncer de mama T-47D y MDA-MB-231.

Se aislaron EVs de las células MDA-MB-231 WT, shC, shCAV1, shLUC y shTNC y se enviaron Laboratorio del Dr. Jay Heinicke, en la Universidad de Washington, Estados Unidos para su análisis proteómico. En este análisis se incluyeron muestras de medio de cultivo del que se extrajeron las EVs para detectar las proteínas contaminantes no asociadas a estructuras vesiculares. Se muestra el número total de proteínas identificadas en las EVs de cada línea celular, las proteínas que son exclusivas de las EVs una línea celular o comunes a dos o más muestras de EVs (Figura Suplementaria 3A y C). Las proteínas de comunes en las EVs de células con CAV1 y TNC (WT, shC y shLUC; WT y shLUC) se intersecaron con las proteínas clasificadas como “accesibles en la superficie” de las EVs derivadas de la línea celular humana de leucemia HMC-1 pertenecientes a una base de datos [113] (Figura Suplementaria 3B y D).

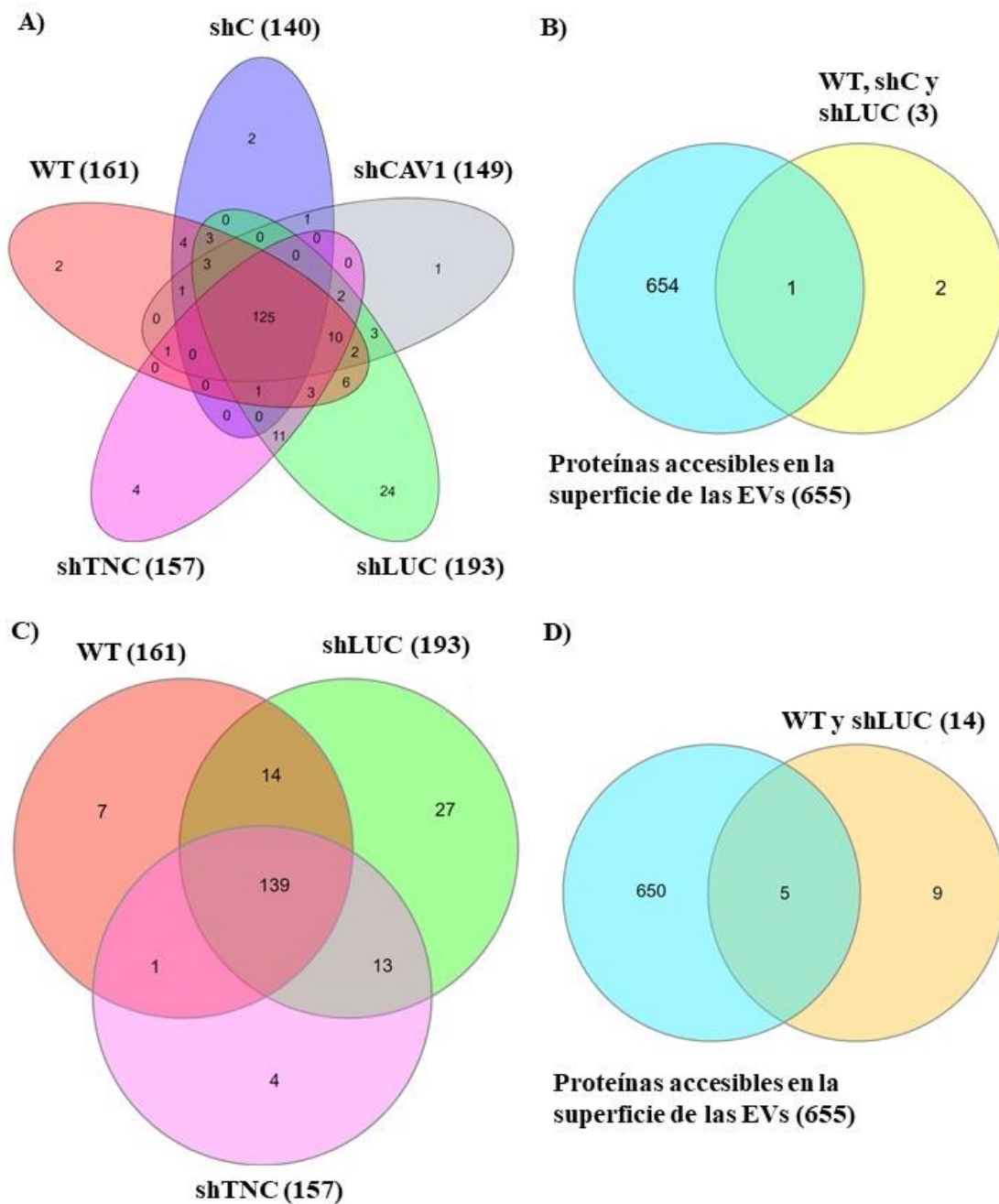


Figura Suplementaria 3. Análisis proteómico de las EVs de células MDA-MB-231 A) Diagrama de Venn de las proteínas identificadas en las EVs de células MDA-MB-231 WT, shC, shCAV1, shLUC y shTNC. Los números indican proteínas que son exclusivas de las EVs una línea celular o comunes en las diferentes muestras de EVs. B) diagrama de Venn de las proteínas clasificadas como “accesibles en la superficie” de las EVs de las células HMC-1 y las proteínas identificadas en las EVs de las células MDA-MB-231 con CAV1 y TNC (WT, shC y shLUC). La única proteína común entre estos dos conjuntos es Transgelina-2. C) diagrama de Venn de las proteínas identificadas en las EVs de células MDA-MB-231 WT, shLUC y shTNC. Los números indican proteínas que son exclusivas de las EVs una línea celular o comunes en las diferentes muestras de EVs. D) diagrama de Venn de las proteínas

clasificadas como “accesibles en la superficie” de las EVs de las células HMC-1 y las proteínas identificadas en las EVs de las células MDA-MB-231 con CAV1 y TNC estudiadas en este trabajo de tesis (WT y shLUC). Las proteínas comunes de estos dos conjuntos son: Subunidad beta de coatómero, Subunidad reguladora 8 de proteasoma 26S, Serina - tARN ligasa citoplasmática, Transgelina-2 y Cadena pesada 1 de la Dineína citoplasmática 1.

Tabla Suplementaria 1. Proteínas identificadas en las EVs de las células MDA-MB-231 WT, shC, shCAV1, shLUC y shTNC. D = Detectado, ND = No Detectado.

UniProt ID	Nombre de la proteína (Inglés)	WT	shC	shCAV1	shLUC	shTNC
O00391	Sulfhydryl oxidase 1	ND	D	D	D	D
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	D	D	D	D	D
P00734	Prothrombin	D	D	D	D	D
P02452	Collagen alpha-1(I) chain	D	D	D	D	D
P02751-15	Fibronectin FN1	D	D	D	D	D
P04114	Apolipoprotein B-100	D	D	D	D	D
P05543	Thyroxine-binding globulin	D	D	D	D	D
P07195	L-lactate dehydrogenase B chain	D	D	D	D	D
P16070	CD44 antigen	D	D	D	D	D
P18206	Vinculin	D	D	D	D	D
P20742	Pregnancy zone protein	D	D	D	D	D
P51884	Lumican	D	D	D	D	D
Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	D	D	D	D	D
P63104	14-3-3 protein zeta/delta	D	D	D	D	D
Q92626	Peroxidasin homolog	D	D	D	D	D
Q99715	Collagen alpha-1(XII) chain	D	D	D	D	D
P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A	D	D	D	D	D
P23527	Histone H2B type 1-O	D	D	D	D	D
P26022	Pentraxin-related protein PTX3	D	D	D	D	D
A6NIZ1	Ras-related protein Rap-1b-like protein	D	D	D	D	D
O00468	Agrin	D	D	D	D	D
O00560	Syntenin-1	D	D	D	D	D
O15230	Laminin subunit alpha-5	D	D	D	D	D
O43854	EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3	D	D	D	D	D
P02649	Apolipoprotein E	D	D	D	D	D
P04350	Tubulin beta-4A chain	D	D	D	D	D

P05556	Integrin beta-1	D	D	D	D	D
P08195	4F2 cell-surface antigen heavy chain	D	D	D	D	D
P08758	Annexin A5	D	D	D	D	D
P08962	CD63 antigen	D	D	D	D	D
P11047	Laminin subunit gamma-1	D	D	D	D	D
P11717	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor	D	D	D	D	D
P12259	Coagulation factor V	D	D	D	D	D
P13639	Elongation factor 2	D	D	D	D	D
P13987	CD59 glycoprotein	D	D	D	D	D
P21333	Filamin-A	D	D	D	D	D
P21926	CD9 antigen	D	D	D	D	D
P24821	Tenascin	D	D	D	D	D
P26006	Integrin alpha-3	D	D	D	D	D
P26038	Moesin	D	D	D	D	D
P28066	Proteasome subunit alpha type-5	D	D	D	D	D
P35052	Glypican-1	D	D	D	D	D
P60033	CD81 antigen	D	D	D	D	D
P60900	Proteasome subunit alpha type-6	D	D	D	D	D
P84077	ADP-ribosylation factor 1	D	D	D	D	D
P98160	Basement membrane-specific heparan sulfate	D	D	D	D	D
Q08380	Galectin-3-binding protein	D	D	D	D	D
Q08431	Lactadherin	D	D	D	D	D
Q15758	Neutral amino acid transporter B(0)	D	D	D	D	D
Q8WUM4	Programmed cell death 6-interacting protei	D	D	D	D	D
Q99878	Histone H2A type 1-J	D	D	D	D	D
Q9BXJ4	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 3	D	D	D	D	D
Q9Y490	Talin-1	D	D	D	D	D
Q9Y4K0	Lysyl oxidase homolog 2	D	D	D	D	D
A0A2R8Y422	40S ribosomal protein S27a	D	D	D	D	D
B2R4R0	Histone H4	D	D	D	D	D
P10643	Complement component C7	D	D	D	D	D
P05023	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	D	D	D	D	D
P51149	Ras-related protein Rab-7a	D	D	D	D	D
P11021	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	D	ND	D	D	D

P02786	Transferrin receptor protein 1	D	D	D	D	D
P04439	HLA class I histocompatibility antigen, A alpha chain	D	D	D	D	D
P04899	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	D	D	D	D	D
P11166	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1	D	D	D	D	D
P13473	Lysosome-associated membrane glycoprotein	D	D	D	D	D
P22392	Nucleoside diphosphate kinase B	D	D	D	D	D
P35609	Alpha-actinin-2	D	D	D	D	D
P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	D	D	D	D	D
P62258	14-3-3 protein epsilon	D	D	D	D	D
P78371	T-complex protein 1 subunit beta	D	D	D	D	D
Q00610	Clathrin heavy chain 1	D	D	D	D	D
O43707	Alpha-actinin-4	D	D	D	D	D
P35579	Myosin-9	D	D	D	D	D
P25788	Proteasome subunit alpha type-3	D	D	D	D	D
Q8NHW5	60S acidic ribosomal protein P0-like	D	D	D	D	D
P09972	Fructose-bisphosphate aldolase C	D	D	D	D	D
P27348	14-3-3 protein theta	D	D	D	D	D
P49327	Fatty acid synthase	D	D	D	D	D
P60842	Eukaryotic initiation factor 4A-I	D	D	D	D	D
P05546	Heparin cofactor 2	D	D	D	D	D
P35442	Thrombospondin-2	D	D	D	D	D
P25789	Proteasome subunit alpha type-4	D	ND	D	D	D
Q14764	Major vault protein	D	ND	D	D	D
P21589	5'-nucleotidase	D	D	D	D	D
P04745	Alpha-amylase 1A	D	D	D	D	D
P23526	Adenosylhomocysteinase	D	D	D	D	D
P04278	Sex hormone-binding globulin	D	D	D	D	D
O14818	Proteasome subunit alpha type-7	D	D	D	D	D
P25787	Proteasome subunit alpha type-2	D	D	D	D	D
Q9GZM7	Tubulointerstitial nephritis antigen-like	D	D	D	D	D
P49720	Proteasome subunit beta type-3	D	ND	D	D	D
P00533	Epidermal growth factor receptor	D	D	D	D	D

P22234	Multifunctional protein ADE2	D	D	D	D	D
P01031	Complement C5	D	D	D	D	D
Q12805	EGF-containing fibulin-like extracellular	D	D	D	D	D
P48509	CD151 antigen	D	D	D	D	D
Q06828	Fibromodulin	D	D	D	D	D
O95445	Apolipoprotein M	D	D	D	D	D
P29401	Transketolase	D	D	D	D	D
P00742	Coagulation factor X	D	D	D	D	ND
P17987	T-complex protein 1 subunit alpha	D	ND	D	D	D
Q8TAA3	Proteasome subunit alpha-type 8	D	ND	D	D	D
P37802	Transgelin-2	D	D	ND	D	ND
P02647	Apolipoprotein A-I	D	D	D	D	D
O00754	Lysosomal alpha-mannosidase	D	D	D	D	D
O14786	Neuropilin-1	D	D	D	D	D
O60568	Multifunctional procollagen lysine hydroxylase and glycosyltransferase LH3	D	D	D	D	D
O94985	Calsyntenin-1	D	D	D	D	D
P01130	Low-density lipoprotein receptor	D	D	D	D	D
P02458	Collagen alpha-1(II) chain	D	D	D	D	D
P07602	Prosaposin	D	D	D	D	D
P07686	Beta-hexosaminidase subunit beta	D	D	D	D	D
P08236	Beta-glucuronidase	D	D	D	D	D
P08519	Apolipoprotein(a)	D	D	D	D	D
P12814	Alpha-actinin-1	D	D	D	D	D
P15586	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	D	D	D	D	D
P17301	Integrin alpha-2	D	D	D	D	D
P29317	Ephrin type-A receptor 2	D	D	D	D	D
P48740	Mannan-binding lectin serine protease 1	D	D	D	D	D
P55268	Laminin subunit beta-2	D	D	D	D	D
Q02809	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	D	D	D	D	D
Q06481	Amyloid beta precursor like protein 2	D	D	D	D	D
Q12860	Contactin-1	D	D	D	D	D
Q13822	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 2	D	D	D	D	D
Q8NHP8	Putative phospholipase B-like 2	D	D	D	D	D
Q92820	Gamma-glutamyl hydrolase	D	D	D	D	D

Q92896	Golgi apparatus protein 1	D	D	D	D	D
Q9UM47	Neurogenic locus notch homolog protein 3	D	D	D	D	D
P35555	Fibrillin-1	D	D	D	D	D
P42785	Lysosomal Pro-X carboxypeptidase	D	D	D	D	D
Q9BX97	Plasmalemma vesicle-associated protein	D	D	D	D	D
Q8N3T6	Transmembrane protein 132C	D	D	D	D	D
P13010	X-ray repair cross-complementing protein 5	D	ND	D	D	D
P80723	Brain acid soluble protein 1	ND	ND	D	D	ND
P49746	Thrombospondin-3	D	D	D	D	ND
Q92859	Neogenin	D	D	ND	D	D
P05106	Integrin beta-3	ND	D	ND	ND	ND
Q9Y4G6	Talin-2	D	D	ND	ND	ND
Q9UK55	Protein Z-dependent protease inhibitor	D	D	D	D	ND
Q12884	Prolyl endopeptidase FAP	D	ND	D	D	D
P53634	Dipeptidyl peptidase 1	D	D	D	D	D
P16035	Metalloproteinase inhibitor 2	ND	ND	ND	D	D
Q86UX7	Fermitin family homolog 3	D	D	D	ND	ND
P30041	Peroxiredoxin-6	D	D	ND	D	ND
Q00796	Sorbitol dehydrogenase	D	ND	D	D	D
O15427	Monocarboxylate transporter 4	ND	ND	ND	D	D
P27105	Stomatin	ND	D	ND	ND	ND
Q9HAV0	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4	ND	ND	ND	D	ND
Q86VP6	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	D	ND	D	D	D
P00450	Ceruloplasmin	D	ND	ND	D	D
A8MTJ3	Guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha-3	ND	ND	D	D	D
P19320	Vascular cell adhesion protein 1	D	ND	D	D	D
Q14204	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	D	ND	D	D	D
P06727	Apolipoprotein A-IV	D	ND	D	ND	D
P14625	Endoplasmic reticulum chaperone protein	D	ND	ND	D	D
P41250	Glycine--tRNA ligase	D	ND	ND	D	D
P08572	Collagen alpha-2(IV) chain	ND	ND	D	ND	ND
P20774	Mimecan	D	D	ND	ND	ND
Q9UBG0	C-type mannose receptor 2	D	D	ND	ND	ND
P50395	Rab GDP dissociation inhibitor beta	D	D	ND	D	ND
P62195	26S proteasome regulatory subunit 8	D	ND	ND	D	ND

Q01082	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	ND	ND	D	D	D
P46940	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	ND	ND	ND	D	ND
P29279	CCN family member 2	ND	ND	ND	D	ND
Q9H4B7	Tubulin beta-1 chain	D	D	ND	ND	ND
P49591	Serine--tRNA ligase, cytoplasmic	D	ND	ND	D	ND
P55060	Exportin-2	D	ND	ND	D	ND
Q5JWF2	Guanine nucleotide-binding protein G(s) su	ND	ND	D	D	ND
O00410	Importin-5	D	ND	ND	D	ND
P00749	Urokinase-type plasminogen activator	D	ND	ND	D	ND
P53618	Coatmer subunit beta	D	ND	ND	D	ND
P12268	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	ND	ND	D	D	ND
P01137	Transforming growth factor beta-1 proprotein	ND	ND	ND	D	D
P08294	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	ND	ND	ND	D	D
P08581	Hepatocyte growth factor receptor	ND	ND	ND	D	D
P13797	Plastin-3	ND	ND	ND	D	D
P19105	Myosin regulatory light chain 12A	ND	ND	ND	D	D
P78504	Protein jagged-1	ND	ND	ND	D	D
Q16270	Insulin-like growth factor-binding protein	ND	ND	ND	D	D
Q16881	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	ND	ND	ND	D	D
Q99523	Sortilin	ND	ND	ND	D	D
P61106	Ras-related protein Rab-14	ND	ND	ND	D	ND
Q14152	Eukaryotic translation initiation factor 3	ND	ND	ND	D	ND
Q7L2H7	Eukaryotic translation initiation factor 3	ND	ND	ND	D	ND
P12081	Histidine--tRNA ligase, cytoplasmic	ND	ND	ND	D	ND
P34932	Heat shock 70 kDa protein 4	ND	ND	ND	D	ND
Q15393	Splicing factor 3B subunit 3	ND	ND	ND	D	ND
Q7KZF4	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	ND	ND	ND	D	ND
P48059	LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein 1	D	ND	ND	ND	ND
Q8NHL6	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 1	D	ND	ND	ND	ND
O75533	Splicing factor 3B subunit 1	ND	ND	ND	D	ND
P02760	Protein AMBP	ND	ND	ND	D	ND

P07951	Tropomyosin beta chain	ND	ND	ND	D	ND
P22413	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 1	ND	ND	ND	D	ND
P30566	Adenylosuccinate lyase	ND	ND	ND	D	ND
P53621	Coatamer subunit alpha	ND	ND	ND	D	ND
P62330	ADP-ribosylation factor 6	ND	ND	ND	D	ND
Q03405	Urokinase plasminogen activator surface receptor	ND	ND	ND	D	ND
Q07021	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	ND	ND	ND	D	ND
Q14563	Semaphorin-3A	ND	ND	ND	D	ND
Q15149	Plectin	ND	ND	ND	D	ND
Q16706	Alpha-mannosidase 2	ND	ND	ND	D	ND
Q16851	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	ND	ND	ND	D	ND
Q9Y262	Eukaryotic translation initiation factor 3	ND	ND	ND	D	ND
P02545	Prelamin-A/C	ND	ND	ND	ND	D
P98088	Mucin-5AC	ND	ND	ND	ND	D
Q93088	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1	ND	ND	ND	ND	D
Q9Y2E5	Epididymis-specific alpha-mannosidase	ND	ND	ND	ND	D